

MESTRADO

CONTROLO DE QUALIDADE

Avaliação do efeito de moléculas de origem natural e seus derivados em mecanismos de degradação de proteínas

Vera Alexandra de Macedo Ribeiro

M

2017





Avaliação do efeito de moléculas de origem natural e seus derivados em mecanismos de degradação de proteínas

Vera Alexandra de Macedo Ribeiro

Dissertação de 2º ciclo de estudos conducente

ao Grau de Mestre em Controlo de Qualidade

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Prof. Doutor David M. Pereira e coorientação da Prof. Doutora Patrícia Valentão

Porto, Junho 2017

According to the law, is not allowed to reproduce any part of this thesis

De acordo com a legislação em vigor, não é permitida a reprodução de qualquer parte
desta dissertação.

Orientador

David M. Pereira

Professor Doutor David Alexandre Micael Pereira
Departamento de Ciências Químicas
Laboratório de Farmacognosia
Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto

Co-orientador

Patrícia Valentão

Professora Doutora Patrícia Carla Ribeiro Valentão
Departamento de Ciências Químicas
Laboratório de Farmacognosia
Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto

Diretor do Mestrado em Controlo de Qualidade

Beatriz Oliveira

Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira
Departamento de Ciências Químicas
Laboratório de Bromatologia e Hidrologia
Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda, cooperação e encorajamento de algumas pessoas que merecem meus sinceros agradecimentos. Nenhum foi mais especial que outro, cada um foi especial à sua maneira.

Ao meu orientador, Professor Dr. David Pereira do Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela orientação, disponibilidade, paciência, aprendizagem e a oportunidade de realizar este trabalho.

À minha co-orientadora, Professora Dr^a Patrícia Valentão do Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, pela disponibilidade, orientação e a possibilidade de realizar este trabalho.

À Professora Dr^a Paula Andrade, responsável pelo Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por ter me recebido no laboratório e ter colocado todas as condições à minha disposição.

À Professora Dr^a Beatriz Oliveira do Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, por toda a ajuda e disponibilidade.

À minha família, em particular, aos meus pais Laura e João, por toda paciência, incentivo e apoio, sem eles esta dissertação não era possível.

À Matos e ao Rafa que sempre estiveram lá, que sempre aturaram todas as paranoias e maluqueiras, que sempre me deram a mão quando foi preciso, longe ou perto estiveram presentes.

Ao Renato, o colega do lado, que teve que me aturar nos meus momentos do mais chata que podia ser, por toda ajuda, paciência e encaminhamento.

À Daniela, a paz de alma, por toda a paciência para me ensinar tudo e aconselhar sempre que precisei.

Ao Gonçalo, o “paranoico”, pela hora “sagradinha” do café da tarde e pelos aconselhamentos.

A todos que partilharam comigo este ano por todas as risadas, por todos os momentos, fora e dentro do laboratório, obrigada.

“Dreams are often most profound when
they seem the most crazy.”

Sigmund Freud

Índice

Agradecimentos	iv
Índice	v
Índice de tabelas	vii
Índice de figuras.....	viii
Abreviaturas.....	ix
Resumo	1
Abstract.....	2
1. Introdução	3
1.1. Retículo Endoplasmático e vias de sinalização.....	4
1.2. Proteossoma.....	8
1.3. Produtos Naturais	9
1.3.1. <i>Cyperaceae</i> e seus metabolitos.....	10
2. Objetivos.....	11
3. Material e Métodos.....	13
3.1. Extração das benzoquinonas.....	14
3.2. Cultura celular.....	14
3.3. Viabilidade celular.....	14
3.3.1. MTT	14
3.3.2. LDH	15
3.4. Morfologia Celular	16
3.5. Espécies reativas de oxigénio.....	17
3.6. Caspases	17
3.6.1. Caspase -3/-7	17
3.6.2. Caspase -4.....	17
3.6.3. Caspase -9.....	18
3.7. Doseamento do Ca^{2+}	18
3.8. Inibidores de vias da UPR.....	18
3.8.1. Salubrinal e 4 μ 8C	18

3.9.	Proteossoma 20S.....	19
4.	Resultados e Discussão.....	20
4.1.	Viabilidade Celular.....	21
4.2.	Morfologia celular.....	27
4.3.	Formação de EROs.....	27
4.4.	Caspases.....	28
4.4.1.	Caspase 3/7.....	28
4.4.2.	Caspase 4.....	29
4.4.3.	Caspase 9.....	29
4.5.	Doseamento do Ca^{2+}	30
4.6.	Inibidores de vias da UPR.....	31
4.6.1.	4 μ 8C e Salubrinal.....	31
4.7.	Proteossoma 20S.....	33
5.	Conclusão.....	36
6.	Bibliografia.....	38

Índice de tabelas

Tabela 1 - Citotoxicidade (IC_{50}) e inibição do proteossoma 20S (IC_{50}) das benzoquinonas estudadas neste trabalho	23
--	----

Índice de figuras

Figura 1 – Vias de sinalização celular envolvidas no stress reticular.....	6
Figura 2 – Vias extrínseca e intrínseca de apoptose e respetiva associação com as caspases.	7
Figura 3 - Representação esquemática da constituição do proteossoma 26S.....	8
Figura 4 – Representação geral dos diferentes tipos de quinonas.	10
Figura 5 - Redução mitocondrial do MTT a formazano.	15
Figura 6 – Representação esquemática da redução de NADH a NAD ⁺ pela enzima LDH com formação de lactato.....	16
Figura 7 -Representação esquemática do ensaio utilizando o Proteossoma 20S.....	19
Figura 8 – Efeito das benzoquinonas na viabilidade (A) e integridade da membrana celular (B) na linha celular A549.	22
Figura 9 - Efeito das benzoquinonas na viabilidade (A) e integridade da membrana celular (B) na linha celular AGS.	24
Figura 10 - Efeito das benzoquinonas na viabilidade na linha celular MRC-5.....	26
Figura 11 – Avaliação da alteração na morfologia celular em AGS pela incubação com ciperquinona e hidroxyciperquinona na concentração do IC ₅₀ por 24 horas de incubação com a coloração Giemsa com 40x de ampliação (setas a vermelho: fragmentação nuclear; preto: condensação da cromatina).....	27
Figura 12 - Efeito das benzoquinonas na produção de EROs na linha celular AGS.....	28
Figura 13 - Efeito das benzoquinonas na ativação das caspases 3/7 na linha celular AGS.	28
Figura 14 - Efeito das benzoquinonas na ativação da caspase 4 da célula na linha celular AGS.	29
Figura 15 - Efeito das benzoquinonas na ativação da caspase 9 na linha celular AGS.....	30
Figura 16 - Efeito das benzoquinonas na libertação de Ca ²⁺ da célula na linha celular AGS.	31
Figura 17 - Efeito das benzoquinonas na presença do inibidor 4μ8C na linha celular AGS.	32
Figura 18 - Efeito das benzoquinonas na presença do inibidor salubrinal na linha celular AGS.	33
Figura 19 -Efeito das benzoquinonas na atividade da subunidade catalítica do proteossoma 26S (proteossoma 20S).....	34
Figura 20 - Estruturas químicas das benzoquinonas estudadas com a evidência das diferenças entre elas.	35

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATF4	Factor de transcrição ativador 4
ATF6	Factor de transcrição ativador 6
CHOP	CCAAT/proteína potenciadora de ligação
eIF2 α	Factor de iniciação eucariótico 2 α
ERAD	Degradação associada ao RE
EROs	Espécies reativas de oxigénio
IRE-1 α	Enzima que requer inositol-1 α
PERK	Cinase do RE como PKR
RE	Retículo Endoplasmático
REL	Retículo Endoplasmático Liso
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RIDD	Decaimento dependente da regulação do IRE1
SERCA	Bomba retículo sarco/endoplasmático Ca ²⁺ -ATPase
UPR	Resposta a proteínas <i>unfolded</i>
XBP-1	Proteína de ligação X-box 1

Resumo

A família *Cyperacea* está bem distribuída em todo o hemisfério, com pelo menos quinze espécies do género *Cyperus* descritas em Portugal. No que diz respeito à sua composição química, a diversidade em quinonas pode ser destacada.

As quinonas são dicetonas derivadas de compostos aromáticos com dois grupos carbonilo na posição *orto* ou *para* num anel insaturado de seis carbonos. De acordo com a sua estrutura, as quinonas podem ser classificadas como benzoquinonas (anel benzénico), antraquinonas (anel antracénico) e naftoquinonas (anel naftalénico).

Neste trabalho, foram estudadas algumas benzoquinonas isoladas do género *Cyperus*, nomeadamente a ciperaquinona, dihidrociperaquinona, tetrahidrociperaquinona, hidroxiciperaquinona e scabequinona em várias células cancerígenas humanas e uma linha celular não cancerígena. O seu efeito citotóxico foi estudado, bem como o seu potencial de inibição do proteossoma 20S enquanto estratégia de modulação da proteostase, assim como o seu efeito nas vias que interferem no funcionamento do retículo endoplasmático e homeostase do Ca^{2+} .

Com um IC_{50} de 1,12 μM foi a hidroxiciperaquinona que revelou ser a molécula mais promissora nos ensaios de inibição do proteossoma 20S, seguida da scabequinona com IC_{50} de 1,57 μM . Estes compostos foram testados nas linhas celulares A549 (cancro do pulmão), AGS (adenocarcinoma gástrico) e MRC-5 (fibroblastos do pulmão). A hidroxiciperaquinona exibiu também a maior toxicidade com um IC_{50} baixo numa gama de valores entre 1,7 e 3,0 μM . A menos tóxica foi a tetrahidrociperaquinona para todas as linhas celulares testadas. A linha celular mais suscetível a estas benzoquinonas foi a linha celular AGS.

Considerando os nossos resultados, foi possível verificar que estas benzoquinonas podem influenciar o comportamento normal do retículo endoplasmático pela alteração da homeostase Ca^{2+} . Por outro lado, e sendo a UPR responsável por regular os níveis de síntese de proteínas, apenas a ciperaquinona mostrou capacidade de ativar esta resposta à ativação de mecanismos de morte celular.

Assim, com este trabalho, pretende-se revelar o potencial dos produtos naturais como novas fontes para desenvolver novos medicamentos contra o cancro.

Abstract

The *Cyperacea* family is well distributed throughout the hemisphere, with at least fifteen species of the genus *Cyperus* being described in Portugal. In what regards their chemical composition, their diversity in quinones is to be highlighted.

Quinones are diketones derived from aromatic compounds with two carbonyl groups in the *orto* or *para* positions an unsaturated ring of six carbons. According to their structure, quinones may be sorted as benzoquinones (benzene ring), anthraquinones (anthracene ring) and naphthoquinones (naphthalene ring).

In this work, we used some benzoquinones and their derivatives found in *Cyperus* particularly cyperaquinone, dihydrocyperaquinone, tetrahydrocyperaquinone, hydroxycyperaquinone and scabequinone in several human cancer cells and a normal cell line. Its cytotoxic effect was studied, as well as its potential for 20S proteasome inhibition as a strategy for modulating proteostasis, as well as its effect on pathways that interfere with the function of the endoplasmic reticulum and calcium homeostasis.

With an IC_{50} of 1.12 μM , hydroxycyperaquinone that revealed to be the most promising molecule in proteasome 20S assays followed the scabequinone with an IC_{50} of 1.57 μM . These compounds were tested in cell line A549 (lung cancer), AGS (gastric adenocarcinoma) and MRC-5 (lung fibroblasts). It is the hydrocyperaquinone that exhibit the major toxicity with a lower IC_{50} in a range of 1.7 and 3.0 μM and the less toxic is the tetrahydrocyperaquinone for all cells lines tested. The cell line more susceptible for these benzoquinones was AGS cell line.

Considering our results, it was possible to verify that these benzoquinones can influence the normal behaviour of the endoplasmic reticulum by the alteration of Ca^{2+} homeostasis. In other hand, and UPR being responsible for regulating protein synthesis levels, only cyperaquinone show ability to activated this response leading to the activation of cell death mechanisms.

Therefore, with this work, we pretend to reveal the potential of natural products as new sources for develop new cancer drugs.

1. Introdução

1.1. Retículo Endoplasmático e vias de sinalização

Olhando para a arquitetura da célula eucariótica, esta é constituída por diversos organelos celulares, os quais desempenham funções essenciais à vida. O núcleo encontra-se rodeado por uma membrana dupla que toma a designação de envelope nuclear. A presença de poros nesta membrana permite a comunicação do núcleo com o citosol (1-3).

A membrana nuclear externa é contígua à membrana do retículo endoplasmático (RE), estruturalmente definida como uma rede de sacos e tubos interligados de membrana que se estendem ao longo da célula (1-3). O RE é o principal organelo celular responsável pela síntese, conformação, modificação e entrega de proteínas nos seus locais de destino. Desempenha ainda um papel fundamental na síntese de lípidos e na homeostase do Ca^{2+} intracelular, sendo um dos mais importantes reservatórios deste catião, chegando os seus níveis a serem 500 vezes superiores aos encontrados no citoplasma (1-4). De forma a controlar o gradiente de Ca^{2+} na célula, o RE possui uma bomba retículo sarco/endoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA), considerada uma das mais importantes ATPases da célula (5-8).

Proteínas com destino marcado para o complexo de Golgi, assim como proteínas marcadas para a superfície da célula são transportadas por vesículas de transporte de organelo para organelo e, nalguns casos, a partir do organelo para a membrana plasmática ou para o exterior da célula. Do citosol para o RE são transferidos dois tipos de proteínas: proteínas solúveis em água, que são transferidas completamente através da membrana do RE e libertadas para dentro do seu lúmen, e proteínas transmembranares que são apenas parcialmente transferidas através da membrana do RE e incorporadas (2).

Ao contrário das proteínas que entram no núcleo, mitocôndrias, cloroplastos, e peroxissomas, a maioria das proteínas que entra no RE começa a ser inserida através da membrana do RE antes de a cadeia polipeptídica estar completamente sintetizada. Este processo requer que o ribossoma sintetize a proteína ligada à membrana do RE. Assim, são formadas zonas que tomam a designação de retículo endoplasmático rugoso (RER) uma vez que, quando visualizadas ao microscópio eletrónico, apresentam uma aparência rugosa (2-4). Proteínas de membrana sintetizadas recentemente permanecem associadas à membrana do RER, enquanto as proteínas que vão ser segregadas acumulam-se no lúmen do RE. O RER é particularmente abundante em células especializadas que produzem uma grande quantidade de proteínas específicas para serem segregadas. São exemplos os linfócitos, para produzirem anticorpos; as células pancreáticas para sintetizarem enzimas digestivas; e as células das ilhotas de Langerhans que produzem os polipéptidos glucagon e insulina. Nestas células secretoras, uma grande parte do citosol é preenchido com RER e vesículas secretoras (3).

As regiões do RE sem ribossomas denominam-se de retículo endoplasmático liso (REL). Na maioria das células o REL é pouco abundante; no entanto, aparece em elevada quantidade e bastante desenvolvido nos hepatócitos. Este é o local de síntese de hormonas nas células das glândulas suprarrenais (2, 3). É ainda responsável pela síntese de ácidos gordos e fosfolípidos, sequestro de Ca^{2+} do citosol, libertação e recaptção de Ca^{2+} do RE, processos envolvidos na resposta rápida a diversos sinais extracelulares (2, 3).

As enzimas no REL do fígado podem também modificar ou desintoxicar quimicamente substâncias tais como, o álcool, pesticidas e carcinogéneos, ao convertê-los em produtos conjugados hidrofílicos mais facilmente eliminados pelo organismo. Assim, altas doses destas substâncias levam a uma grande proliferação do REL nas células hepáticas (3).

Perturbações no funcionamento do RE, como o *stress* oxidativo ou privação de glucose, podem levar à acumulação de proteínas com uma conformação incorreta, total ou parcial, da sua cadeia polipeptídica. A acumulação destas proteínas no lúmen do RE leva a uma resposta de emergência, a UPR (*unfolded protein response*). Esta resposta visa restabelecer a função normal do RE, uma vez que a acumulação destas proteínas leva a um estado de *stress* do organelo e, conseqüentemente, da célula, podendo levar a apoptose e autofagia (9-11). A desregulação da homeostase pode estar associada ao *stress* oxidativo, hiperglicemia, resposta inflamatória, exposição a produtos químicos e privação de Ca^{2+} . A perda da homeostase celular leva à agregação e enrolamento incorreto de proteínas no interior do lúmen do RE, causando *stress* e levando à ativação da UPR (9-15).

A UPR é responsável por regular os níveis de síntese de proteínas. Através desta resposta é encontrado um equilíbrio entre a síntese e a degradação proteica, de forma a prevenir a ocorrência de uma sobrecarga da célula (16, 17). Quando ativada, a UPR tem a função de direcionar as proteínas com conformação incorreta para os *chaperones*, com o intuito de sofrerem um redobramento e adquirirem a conformação correta. Por outro lado, estas proteínas podem alternativamente ativar a via de degradação de proteínas associadas ao RE, ERAD (*endoplasmic reticulum-associated protein degradation*) (fig.1). Desta forma, as proteínas serão sujeitas a uma retrotranslocação do RE para o citosol, onde irão sofrer degradação por parte do proteossoma 26S (15, 18, 19).

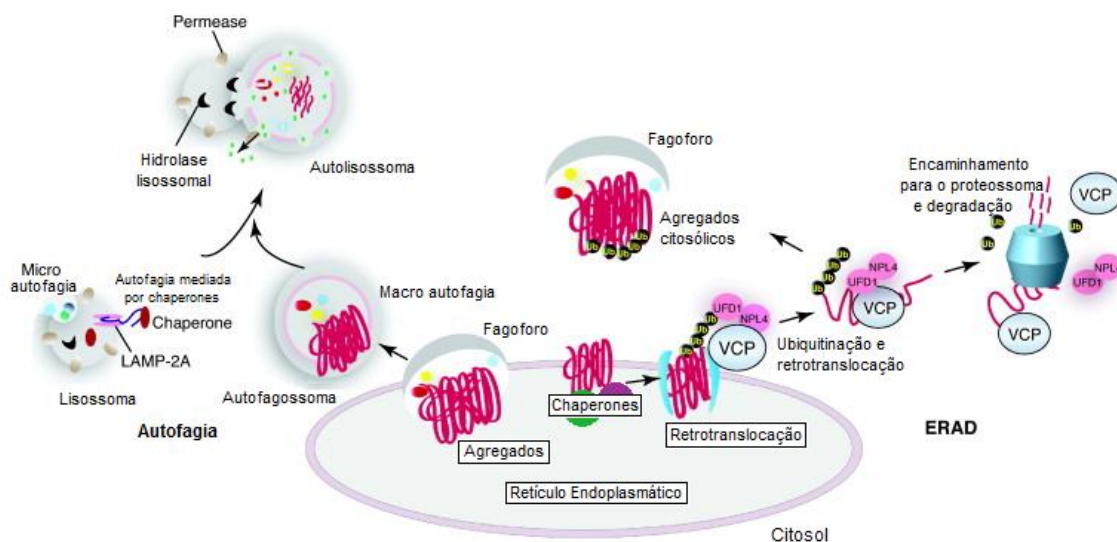


Figura 1 – Vias de sinalização celular envolvidas no stress reticular. Adaptado de (20).

No RE existem três sensores de *stress* que, quando ativados, são capazes de desencadear a UPR: enzima que requer inositol (IRE-1 α), cinase PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) e fator de transcrição ativador 6 (ATF6) (10, 12, 13, 17).

O IRE-1 α é uma cinase e uma endonuclease de RNA, tendo, assim, atividade enzimática dupla. Esta cinase mantém a homeostase do RE através do processamento do mRNA que codifica a proteína de ligação X-box 1 (XBP-1). O IRE1 α ativa a expressão da proteína XBP-1 por excisão de uma sequência de 26 nucleótidos a partir da perda do intrão XBP-1 mRNA (XBP-1u) e criando o fator de transcrição XBP-1s (13, 17). XBP-1s é um fator de transcrição que induz a transcrição de um conjunto de genes para alargar a capacidade de *folding* do RE. Desta forma, promove o retrotransporte de proteínas com conformação incorreta pelo ERAD e a síntese de fosfolípidos e assim, a sobrevivência da célula (21). No entanto, é pela via RIDD (*regulated IRE1-dependent decay*) que o IRE1 α promove a degradação de mRNAs. O IRE1 α codifica primeiro as proteínas sinalizadas para o RE para reduzir o influxo de proteínas durante o *stress* do RE (17).

A PERK é a primeira cinase cuja atividade é aumentada em caso de *stress* no RE e aquela que fosforila o eIF2 α (*eukaryotic initiation factor 2 α*). Esta cinase faz descer os níveis da tradução do mRNA na síntese proteica e ativa o ATF4 (13, 22, 23).

O ATF6 é transferido para o complexo de Golgi, onde é clivado, tornando-se num fator de transcrição ativo (ATF6 α). No complexo de Golgi duas enzimas (SP1 e SP2) clivam o ATF6 α para libertar um fragmento da proteína. Este fragmento é então transferido para o núcleo para aumentar a produção da maquinaria necessária para o *folding* das proteínas no RE (13, 24, 25).

O *stress* prolongado no RE induz a apoptose, através da proteína de ligação CHOP (CCAAT/*enhancer binding protein*). A CHOP aumenta a expressão do ATF4 (10, 26), que

tem um papel importante na restauração da homeostase, estimulando a síntese de CHOP/GADD34, uma subunidade reguladora de um complexo específico de fosfatases do eIF2 α (27, 28).

As caspases têm também um papel bastante relevante na manutenção da homeostase da célula, fazendo parte da maquinaria apoptótica. Estas proteases de cisteína clivam proteínas depois do resíduo de ácido aspártico e desempenham um papel importante quer na inflamação quer na apoptose. De acordo com a sua função podem ser divididas em dois grupos: as caspases -1, -5, e -11 que estão envolvidas na inflamação, enquanto que as caspases -2, -3, -4, -6, -7, -8, -9, -10 e -12 são consideradas caspases apoptóticas (29, 30) (fig.2).

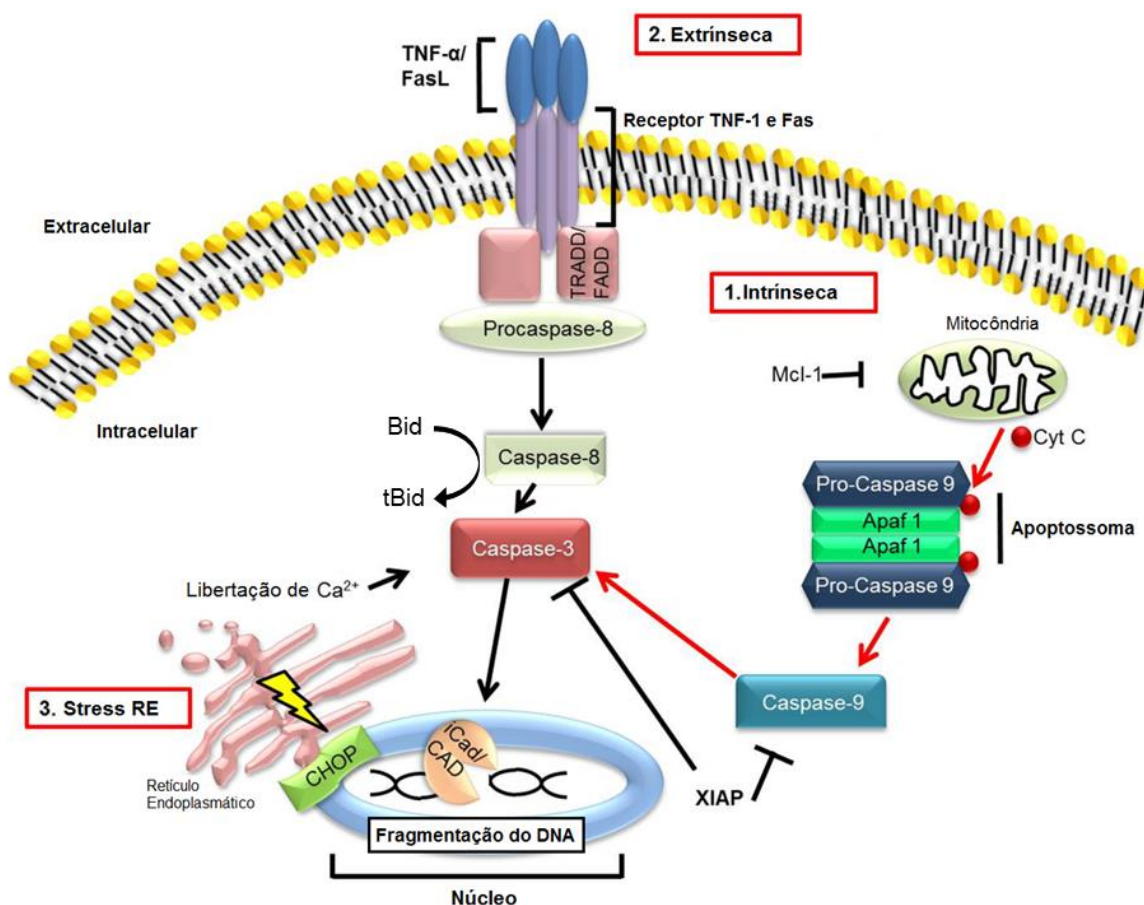


Figura 2 – Vias extrínseca e intrínseca de apoptose e respetiva associação com as caspases. Adaptado de (31).

1.2. Proteossoma

O proteossoma 26S encontra-se localizado no citoplasma e no núcleo das células eucarióticas, sendo formado por duas subunidades: uma reguladora (subunidade 19S) e uma outra catalítica (subunidade 20S) (32-35) (fig.3). No entanto, embora esteja presente em todas as células eucarióticas, existem muitos subtipos desta holoenzima, alguns constitutivos e outros que são específicos do tecido a que pertencem (35). O proteossoma 26S apresenta uma estrutura tridimensional em forma de barril, sendo formada cada subunidade por 14 subunidades homólogas cada. Estas 14 subunidades dispõem-se em 2 anéis de 7 subunidades que se empilham. Assim, como forma uma estrutura parecida a um barril torna o proteossoma um complexo enzimático multicatalítico (32-34). Os componentes dos dois anéis localizados nas extremidades dos barris (subunidade 19S) tomam a designação de subunidades α os dois anéis centrais pertencentes à subunidade 20S são designadas de subunidades β (33).

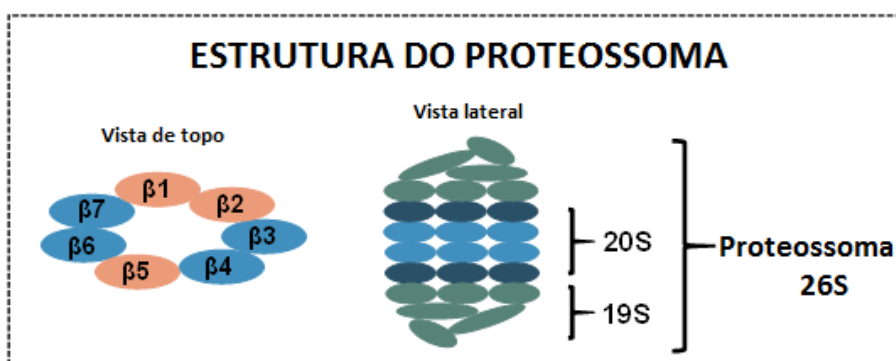


Figura 3 - Representação esquemática da constituição do proteossoma 26S. Adaptado de (35).

A subunidade catalítica 20S possui um peso molecular de 700Kd. É formada por três locais ativos distintos e associados a subunidades β diferentes, correspondendo a $\beta 5$ a atividade do tipo quimiotripsina, a $\beta 2$ a atividade do tipo tripsina e a $\beta 1$ a atividade do tipo caspase (32, 34, 35). No proteossoma 20S as proteínas são desdobradas e clivadas em peptídeos pequenos (35). Ligado a ambas as extremidades do núcleo do proteossoma 20S encontra-se o proteossoma 19S, formando assim o proteossoma 26S (33).

A subunidade reguladora 19S é um complexo proteico também de 700Kd. É composto por 19 subunidades que controlam o acesso ao interior da subunidade 20S, regulam a degradação dependente de ubiquitina e são responsáveis por reconhecer substratos poliubiquitinados e desubiquitinados (33, 34). Nesta subunidade, as proteínas ubiquitinadas são desdobradas num processo dependente de ATP. No entanto, a proteólise que ocorre no núcleo deste complexo enzimático apenas é possível após este desdobramento. Assim, podemos referir que a seletividade do processo de degradação de proteínas não depende apenas da ubiquitinação, mas também da estrutura física do

proteossoma 26S, que é assim construído de modo a que somente proteínas direcionadas entrem no núcleo catalítico e contactem com seus locais proteolíticos (35).

Como referido anteriormente, as subunidades 19S e 20S constituem o proteossoma 26S, formando assim um complexo enzimático considerado como sendo a maior via não lisossomal de degradação de proteínas em células eucarióticas (32). Esta maquinaria proteolítica está envolvida na degradação de proteínas sem a sua conformação tridimensional e com uma conformação incorreta (32, 36). São assim regulados diversos processos celulares como a apoptose, transdução de sinal, ciclo celular, diferenciação celular, mitose e inflamação (32, 37).

Diversas doenças, incluindo cancro e doenças neurodegenerativas, estão intimamente conectadas com a atividade do proteossoma, tornando-o deste um importante alvo farmacológico (38).

No que diz respeito às células tumorais, o proteossoma tem como função assegurar a sua sobrevivência, sendo responsável, pela promoção da proliferação celular e pela proteção da célula tumoral contra a apoptose (32). De forma a atingir a imortalidade, as células tumorais trocam uma eficiente replicação do ADN por uma mais rápida aumentando, consequentemente, as mutações genómicas. Assim, as células passam a acumular grandes quantidades de proteínas com uma conformação tridimensional incorreta, podendo levar à morte da célula. De forma a contornar este processo este problema, as células tumorais aumentam a expressão do proteossoma para eliminar as proteínas com uma conformação tridimensional incorreta e assim sobreviverem (38).

Uma das funções da subunidade reguladora 19S é a remoção de ubiquitina da proteína alvo antes de entrar na subunidade 20S. Se esta desubiquitinação não ocorrer ou for bloqueada, a proteína em questão não poderá ser destruída uma vez que, proteínas ubiquitinadas não passam pelo canal estreito desta subunidade, não chegando ao centro catalítico. Deste modo, a inibição da desubiquitinação torna-se também um importante alvo farmacológico no que diz respeito a interferências na atividade do proteossoma (38).

1.3. Produtos Naturais

O conhecimento adquirido quer da medicina tradicional, quer da investigação científica, tem evidenciado o potencial dos produtos naturais, principalmente dos provenientes de plantas, como fontes de novos compostos com atividade biológica. Os compostos obtidos de produtos naturais têm vindo a ganhar ênfase nos últimos anos, servindo como base ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças, como o cancro (39-42).

A grande diversidade de estruturas que podemos encontrar nos produtos naturais tem vindo a chamar à atenção dos investigadores do ponto de vista químico e biológico.

Estes compostos apresentam grande complexidade estérica e uma estrutura tridimensional bem definida. Estas características conferem-lhes inúmeras vantagens em termos de seletividade e eficiência para alvos biológicos (43, 44).

Um número notável de novas entidades químicas tem vindo a ser isolado a partir de fontes marinhas nas últimas décadas. No entanto, são as fontes terrestres, como as plantas e os microrganismos, que continuam a fornecer um número significativo de novos fármacos (45, 46).

1.3.1. *Cyperaceae* e seus metabolitos

A família *Cyperaceae* encontra-se distribuída por todo o mundo. No entanto, a utilização das diferentes espécies em cada região é feita consoante os costumes, crenças e religião locais. Assim, as plantas desta família botânica podem ser usadas para diferentes fins medicinais, como o tratamento de doenças do estômago e cardíacas, úlceras da pele, como diurético e galactogénico (47-50). Em Portugal estão descritas pelo menos quinze espécies do género *Cyperus* (47).

Diversas moléculas presentes no género *Cyperus* estão descritas como tendo efeitos medicinais (51). Entre essas moléculas estão presentes quinonas (47, 52), flavonoides (47, 53) e sesquiterpenos (47, 54).

No que diz respeito à composição química, destaca-se a diversidade de quinonas. As quinonas são dicetonas derivadas de compostos aromáticos, com dois grupos carbonilo nas posições *orto* ou *para* num anel insaturado de seis carbonos. Podem-se dividir em benzoquinonas, antraquinonas e naftoquinonas, consoante o sistema aromático presente (55) (fig.4).

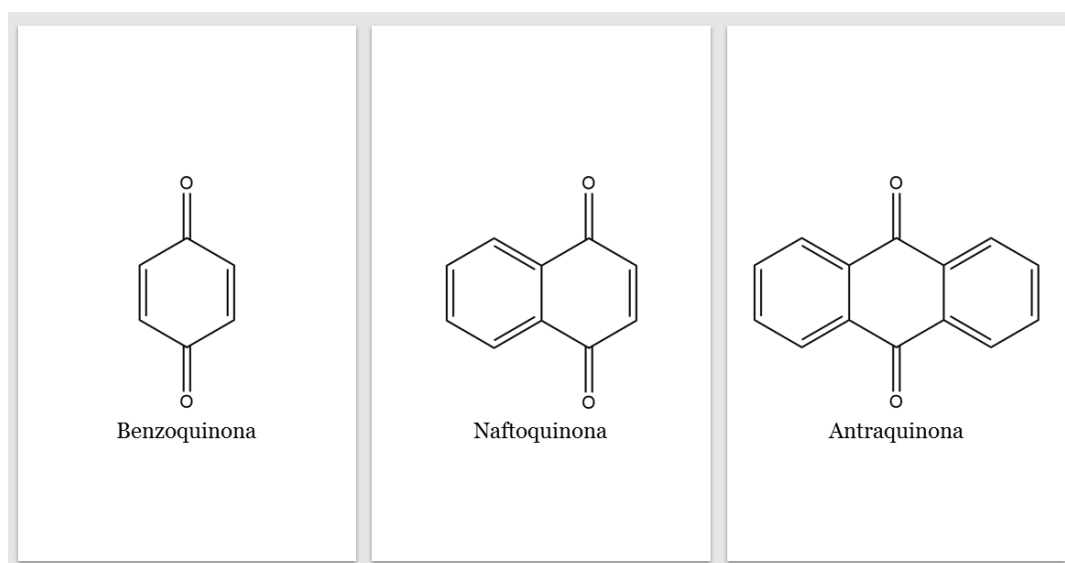


Figura 4 – Representação geral dos diferentes tipos de quinonas.

2. Objetivos

Este trabalho pretende clarificar os mecanismos celulares subjacentes à toxicidade provocada por cinco benzoquinonas (ciperquinona, hidroxyciperquinona, dihidrociperquinona, tetrahidrociperquinona e scabequinona) isoladas de *Cyperus* spp., em linhas celulares do adenocarcinoma gástrico (AGS), cancro do pulmão (A549) e fibroblastos do pulmão (MRC-5).

Assim, os principais objetivos deste trabalho foram:

- Estudar o efeito na viabilidade e na integridade da membrana celular;
- Avaliar as modificações morfológicas celulares provocadas pela exposição a estas benzoquinonas;
- Determinar o envolvimento das caspases na morte celular;
- Determinar as alterações nos níveis de cálcio intracelular derivadas da exposição a estes compostos;
- Perceber se ocorre ativação da UPR como resposta ao *stress* reticular;
- Avaliar a capacidade destas quinonas para inibir o centro catalítico do proteossoma 26S.

3. Material e Métodos

3.1. Extração das benzoquinonas

A extração destas benzoquinonas foi realizada num trabalho anterior por Maria Moreira em 1990. O material vegetal foi sujeito a uma extração por éter de petróleo seguida de clorofórmio. A purificação do extrato obtido foi realizada por cromatografia preparativa em camada fina tendo sido determinado o ponto de fusão. Para elucidação estrutural foram analisados os espectros obtidos por espectrometria de ultravioleta-visível, de infravermelho, de massa, e de ressonância magnética nuclear protónica (47).

3.2. Cultura celular

As células foram descongeladas em 45 mL de meio de cultura DMEM/F-12 (1:1)(1x)+GlutaMAX™-1 para A549, MEN(1x)+GlutaMAX™-1 para MRC-5 e DMEN(1x)+GlutaMAX™-1 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) para AGS, ambos da Gibco) enriquecido com 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de FBS (soro fetal de bovino) a 37°C. Depois de uma centrifugação a 210 g por 5 minutos, o sobrenadante foi rejeitado e o depósito foi ressuspensionado em 15 mL de meio a 37°C. Para se proceder a uma cultura 2D foi colocado num frasco de 300 mL um volume de suspensão celular adequado ao crescimento pretendido, juntamente com 15 mL de meio de cultura. As condições descritas foram adaptadas de da Silva, *et al.*, 2017 (56) e de Pereira, *et al.*, 2014 (57).

3.3. Viabilidade celular

3.3.1. MTT

Após obtenção de cerca 80% de confluência da caixa, o meio foi rejeitado e a caixa lavada duas vezes com 8 mL de HBSS (Hank's balanced salt solution) adquirido na Gibco. Posteriormente, colocou-se 2,5 mL de Tripsina a 0,25% e levou-se o frasco para a estufa a 37 °C e 5% CO₂, durante 5 minutos. De seguida adicionou-se 5 mL de meio e todo o volume da caixa foi recolhido e centrifugado a 1300 rpm durante 3 minutos, a 37°C. O sobrenadante foi rejeitado e o depósito ressuspensionado em 4 mL de meio.

Num eppendorf foram colocados 90 µL de azul de tripano e 10 µL da suspensão celular. Foi preenchida uma câmara de Neubauer com esta solução para se proceder à contagem do número de células presentes na suspensão celular.

Após 24 horas foram preparadas diluições sucessivas do composto a testar, usando, no máximo, 0,5% de DMSO. O meio de cada poço foi aspirado e foram colocados 100 µL de cada diluição do composto em triplicado como descrito anteriormente (56-58).

O ensaio de redução de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) tem sido amplamente usado para quantificar a viabilidade celular (59). Este tipo de ensaios baseia-se no potencial metabólico, aferindo-se, neste caso, a atividade

enzimática mitocondrial das células (fig.5)(60). As células com metabolismo ativo convertem o MTT em formazano, com cor púrpura e um máximo de absorção próximo de 570 nm. Quando as células morrem, estas perdem a capacidade de converter o MTT e assim, a formação de cor serve como um indicador da viabilidade celular (59).

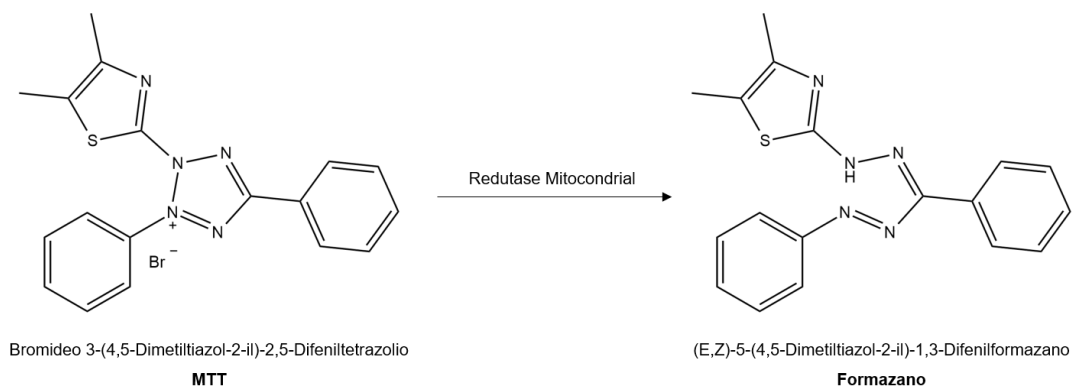


Figura 5 - Redução mitocondrial do MTT a formazano.

O substrato MTT foi preparado numa solução com o meio e adicionado às células em cultura de cada poço depois da remoção do composto a testar, numa proporção de 1:10. Foi feita uma incubação durante 2 horas, a 37°C, após a qual a solução de MTT foi removida. O formazano formado foi dissolvido em 200 µL de uma mistura de DMSO:isopropanol (3:1). Posteriormente mediu-se absorvência a 570 nm, utilizando um leitor de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO (59).

3.3.2. LDH

De forma a estimar o potencial tóxico das benzoquinonas foi realizado o ensaio de libertação da lactato desidrogenase (LDH). Os efeitos citotóxicos do composto são associados à integridade da membrana celular e, assim, a saída de substâncias intracelulares para o meio serve como indicador dessa integridade. A LDH é uma enzima marcadora do citosol e frequentemente usada para estimar a integridade da membrana celular (fig.6) (60).

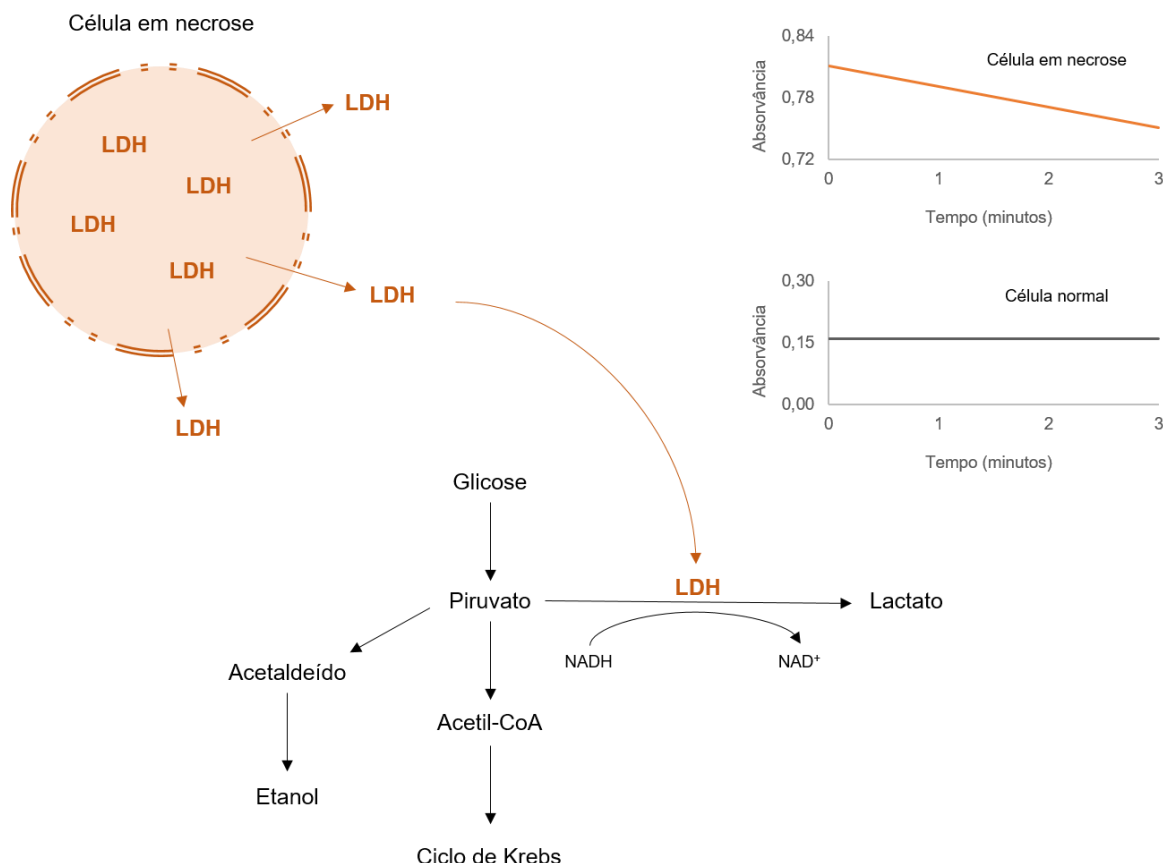


Figura 6 – Representação esquemática da redução de NADH a NAD⁺ pela enzima LDH com formação de lactato.

Foram retirados 20 μ L da solução presente em cada poço para uma nova placa de 96 poços ao final das 24 horas de incubação do composto a testar como descrito anteriormente por Pereira, *et al.*, 2015 e da Silva, *et al.*, 2017 (56, 61). Foram adicionados 25 μ L de uma solução de piruvato e 230 μ L de uma solução de NADH, ambas na concentração de 3mg/20mL. Estas duas soluções foram preparadas em tampão fosfato com pH de 7,4 e foi usado o Triton X-100 a 1% como controlo positivo. A integridade da membrana celular foi aferida pela absorvência registada a 340nm num leitor de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO.

3.4. Morfologia Celular

A linha celular AGS foi cultivada durante 24 horas em placas de 6 poços numa densidade de 50 000 células por poço, com a inclusão de uma lamela no fundo do poço antes da suspensão celular. As células foram colocadas em contacto com as benzoquinonas na concentração do IC₅₀ determinado no ensaio de MTT. Após 24 horas de incubação as células foram lavadas com HBSS e colocadas no gelo com 500 μ L de metanol, durante 30

minutos. Decorrido este período, as lamelas foram lavadas com HBSS e água e adicionou-se uma solução de corante de Giemsa (1:10), por 20 minutos, à temperatura ambiente. Por fim, as lamelas foram novamente lavadas com água e deixadas a secar (58, 62).

3.5. Espécies reativas de oxigénio

As células AGS foram cultivadas em placas pretas de 96 poços, com uma densidade de 15 000 células por poço. Decorrido um ciclo de crescimento das células, o meio foi removido e adicionaram-se 100 µL de uma solução de meio com as benzoquinonas nas concentrações em que o ensaio da LDH não foi positivo e o do MTT mostrou não serem tóxicas. Após 8 horas de incubação com as benzoquinonas lavou-se com HBSS por 30 minutos e adicionou-se uma solução de DCDHF-DA (25 µM) durante 45 minutos. A produção de espécies reativas de oxigénio (EROs) intracelular foi quantificada usando um leitor de placas Cytation 3 Biotek (Ex:490 nm e Em: 520 nm) (58). A estaurosporina foi usada como controlo positivo nas concentrações de 0,120, 0,250 e 0,500 µM.

3.6. Caspases

3.6.1. Caspase -3/-7

As células AGS foram cultivadas em placas brancas de 96 poços, com uma densidade celular de 15 000 células por poço. Após adesão as células foram tratadas com as benzoquinonas durante 8 h, nas concentrações em que o ensaio da LDH foi negativo. Após esta incubação foram retirados 70 µL de sobrenadante, ficando na placa 40 µL de sobrenadante, aos quais se adicionaram 40µL de uma mistura de tampão e substrato do kit Caspase-Glo®. Procedeu-se à incubação durante 30 minutos, para permitir a lise das células e clivagem do substrato da caspase-3/7, de forma a criar um sinal luminescente produzido pela luciferase (56, 62). As células expostas a estaurosporina (500nM) foram usadas como controlo positivo.

3.6.2. Caspase -4

As células AGS foram cultivadas em placas pretas de 96 poços com uma densidade celular de 15 000 células por poço. Após adesão as células foram tratadas com as benzoquinonas durante 8 h, nas concentrações em que o ensaio da LDH foi negativo. Após este período retirou-se o sobrenadante e adicionou-se o substrato de caspase 4 a 50 µM. Foi feita uma incubação durante 150 minutos a 37 °C, seguida da determinação da fluorescência num leitor de placas Cytation™ 3 Biotek (Ex:400 nm e Em: 505 nm) (58). O ácido palmítico foi usado como controlo positivo na concentração de 1 mM.

3.6.3. Caspase -9

As células AGS foram cultivadas em placas de 6 poços (240 000 células por poço). Depois de 24 horas, as células foram incubadas com as benzoquinonas durante 8 h, nas concentrações em que o ensaio da LDH foi negativo. Terminado o tempo de incubação foi retirado o meio e as células lavadas com HBSS com posterior tripsinização e centrifugação a 1300 rpm durante 3 minutos. Posteriormente, adicionou-se o tampão de lise (25 mM HEPES, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl₂ e 5 mM DTT, pH 7,4) durante 30 minutos no gelo e voltou-se a centrifugar a 14 500 rpm por 15 minutos a 4°C (58). No fim da centrifugação o sobrenadante foi removido e o teor de proteína foi quantificado pelo método Bradford (63).

De forma a avaliar a atividade da caspase, alíquotas com 25 µg de proteína foram adicionadas ao tampão de reação (25 mM HEPES, 0,1% CHAPS, 10% sucrose e 5 mM DTT pH 7,4). A reação teve início com a adição do substrato da caspase-9 (50µM) e 2 horas depois de incubação a 37°C foi determinada a fluorescência num leitor de placas Cytation™ 3 Biotek (Ex: 405 nm e Em: 535 nm)(58).

3.7. Doseamento do Ca²⁺

Tal como descrito para o ensaio da avaliação da produção de EROs, a linha celular AGS foi cultivada em placas de 96 poços pretas com uma densidade de 15 000 células por poço. Decorrido um ciclo de crescimento de 24 horas, o meio foi aspirado e adicionou-se 100 µL da sonda fluorescente Fura-2/AM a 5 µM, com a qual foi incubado durante uma hora. Posteriormente procedeu-se à incubação das benzoquinonas por uma hora e o Ca²⁺ foi determinado usando um leitor de placas Cytation 3 Imaging reader (Biotek) (Ex:340 nm e Em: 505 nm / Ex:380 nm e Em: 505 nm) (56).

3.8. Inibidores de vias da UPR

3.8.1. Salubrinal e 4µ8C

À semelhança dos ensaios anteriores, a linha celular AGS foi cultivada em placas de 96 poços numa densidade de 15 000 células por poço. Decorridas 24 horas de crescimento, o meio foi aspirado e 100 µL foram colocados num poço, aos quais se juntaram 100 µL de uma solução de 4µ8C a 5 µM, 100 µL de uma solução de salubrinal a 40 µM e 2 µL de uma solução da benzoquinona em estudo, numa concentração 50 vezes superior à do IC₅₀ obtido no ensaio de MTT. Após 8 horas de incubação realizou-se o ensaio de MTT descrito anteriormente (56). O salubrinal é um inibidor seletivo caracterizado por desfosforilar o

eIF2 α , ou seja, inibidor da PERK enquanto que, 4 μ 8C é um inibidor da ribonuclease IRE1 α sendo assim considerados indutores de *stress* reticular (64, 65).

3.9. Proteossoma 20S

O ensaio do proteossoma 20S foi efetuado numa placa negra de 96 poços onde foram adicionados 50 μ L de uma série de diluições sucessivas das benzoquinonas. Como controlo positivo foi usada a lactacistina na concentração de 10 e 20 μ M, um inibidor de referência do proteossoma 20S.

Em cada poço foram ainda adicionados 25 μ L de 70 ng de proteossoma 20S humano purificado e 25 μ L de uma sonda fluorescente N-Succinil-Leu-Leu-Val-Tir-7-Amido-4-metilcoumarina, numa concentração final de 40 μ M (ambos adquiridos à Enzo). A placa foi posteriormente incubada a 37 °C durante 2 horas, ao abrigo da luz. Decorrido este período, a fluorescência foi determinada num leitor de microplacas Cytation™ 3 (BioTek), a 380 nm (excitação) e a 460 nm (emissão) (56). No caso do proteossoma 20S estar funcional é emitida fluorescência pela quebra do péptido AMC, como se encontra representado na figura 7.

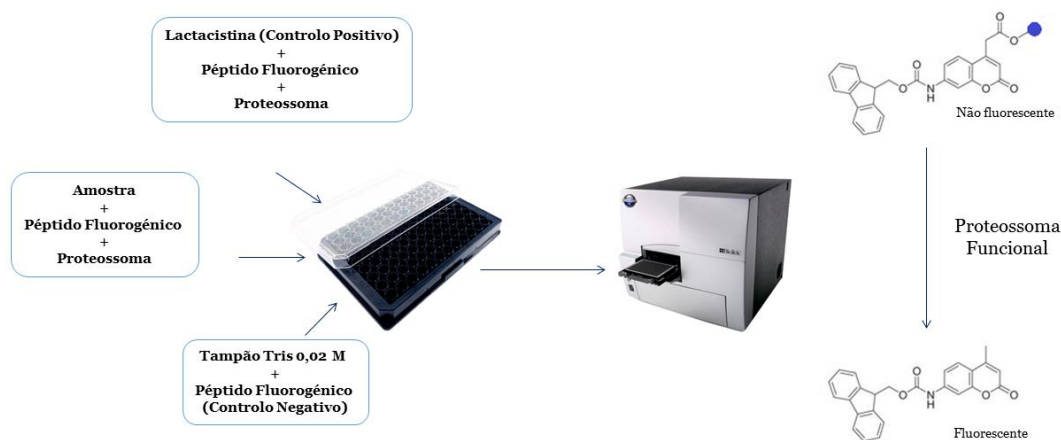


Figura 7 -Representação esquemática do ensaio utilizando o Proteossoma 20S

4. Resultados e Discussão

Neste trabalho, foram usadas as linhas celulares A549, AGS e MRC-5. A linha celular A549 é constituída por células do cancro do pulmão com várias características interessantes no que diz respeito à administração de fármacos. Destas características, podemos salientar a grande área de absorção, a vasculatura extensa e a baixa atividade enzimática extracelular e intracelular que permite uma absorção praticamente instantânea do fármaco na corrente sanguínea (66). No entanto, a linha celular MRC-5 é formada por fibroblastos do pulmão, uma linha celular não cancerígena (67). A linha celular AGS é formada por células do adenocarcinoma gástrico e, uma vez que, a via de administração de fármacos predominante é a via oral, confere ao estômago um papel relevante como um modelo a ter em conta na administração de fármacos (68).

Desta forma, foi avaliada a citotoxicidade, as alterações na morfologia celular, indução de *stress* reticular e ainda mecanismos apoptóticos induzidos por cinco benzoquinonas isoladas do género *Cyperus* nestas linhas celulares. Com o intuito de perceber o potencial destas quinonas como novos alvos terapêuticos para o cancro foi avaliada também a inibição do proteossoma 20S e do proteossoma 26S, uma vez que está envolvido na regulação da síntese/degradação de proteínas. Pretende-se assim, fazer uma relação estrutura/atividade das benzoquinonas isoladas de *Cyperus* spp.

4.1. Viabilidade Celular

Como referido anteriormente, a citotoxicidade foi avaliada em três linhas celulares.

Para a linha celular A549, a benzoquinona que apresentou maior toxicidade foi a hidroxiciperaquinona, com um IC_{50} de 2,98 μM , seguida da ciperaquinona (IC_{50} de 11,31 μM). As restantes três quinonas estudadas apresentaram reduzida citotoxicidade, na ordem dos 50 μM (tabela 1). Todas as quinonas apresentaram LDH positiva nas concentrações mais elevadas, ou seja, ocorreu libertação de LDH para o citosol por rutura da membrana evidenciando necrose, com exceção da ciperaquinona (fig. 8). Uma vez que, a ciperaquinona não mostrou provocar a saída de LDH para o citosol para nenhuma das concentrações testadas, a toxicidade que esta molécula mostra parece assim, não estar relacionada com processos que levem à necrose da célula e, conseqüentemente, à libertação de LDH para o exterior da célula por rotura da membrana celular.

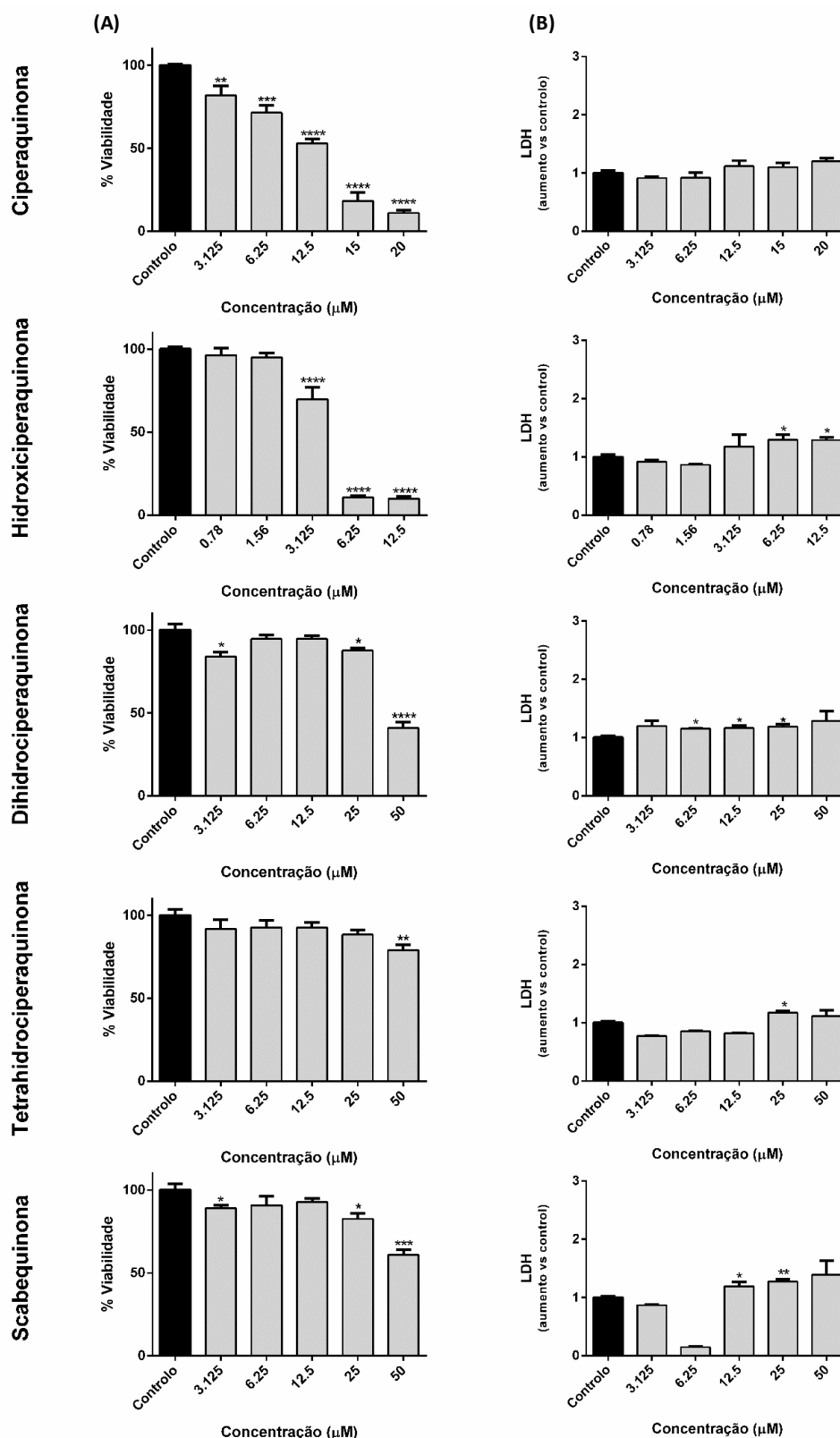


Figura 8 – Efeito das benzoquinonas na viabilidade (A) e integridade da membrana celular (B) na linha celular A549. As células (densidade: 1×10^4) foram incubadas com as diferentes concentrações das benzoquinonas a 37°C, durante 24 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média de cinco concentrações, em triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ comparado com o respetivo controlo.

A linha celular referente ao adenocarcinoma gástrico pareceu ser mais suscetível às benzoquinonas testadas, uma vez que os IC₅₀ de todas as moléculas foram mais baixos comparativamente aos obtidos com a linha celular anterior (tabela 1).

A hidroxiciperaquinona continua a ser a molécula mais tóxica. É a dihidroiciperaquinona que apresenta maior redução do valor do IC₅₀ comparando com a linha celular A549. Contrariamente ao que acontecia nas células do cancro do pulmão, apenas a ciperquinona e a dihidroiciperaquinona apresentam LDH positiva nas concentrações mais elevadas, evidenciando a possível correlação da citotoxicidade provocada com a ocorrência de necrose da célula (fig.9).

Tabela 1 - Citotoxicidade (IC₅₀) e inibição do proteossoma 20S (IC₅₀) das benzoquinonas estudadas neste trabalho

Benzoquinonas	IC₅₀ (μM)			IC₅₀ (μM)
	A549	AGS	MRC-5	20S
Ciperquinona	11,31	2,93	8,70	>50
Hidroxiciperaquinona	2,98	1,69	1,58	1,12
Dihidroiciperaquinona	45,28	16,81	>50	1,94
Tetrahidroiciperaquinona	>50	>50	>50	13,77
Scabequinona	46,62	27,38	28,69	1,57

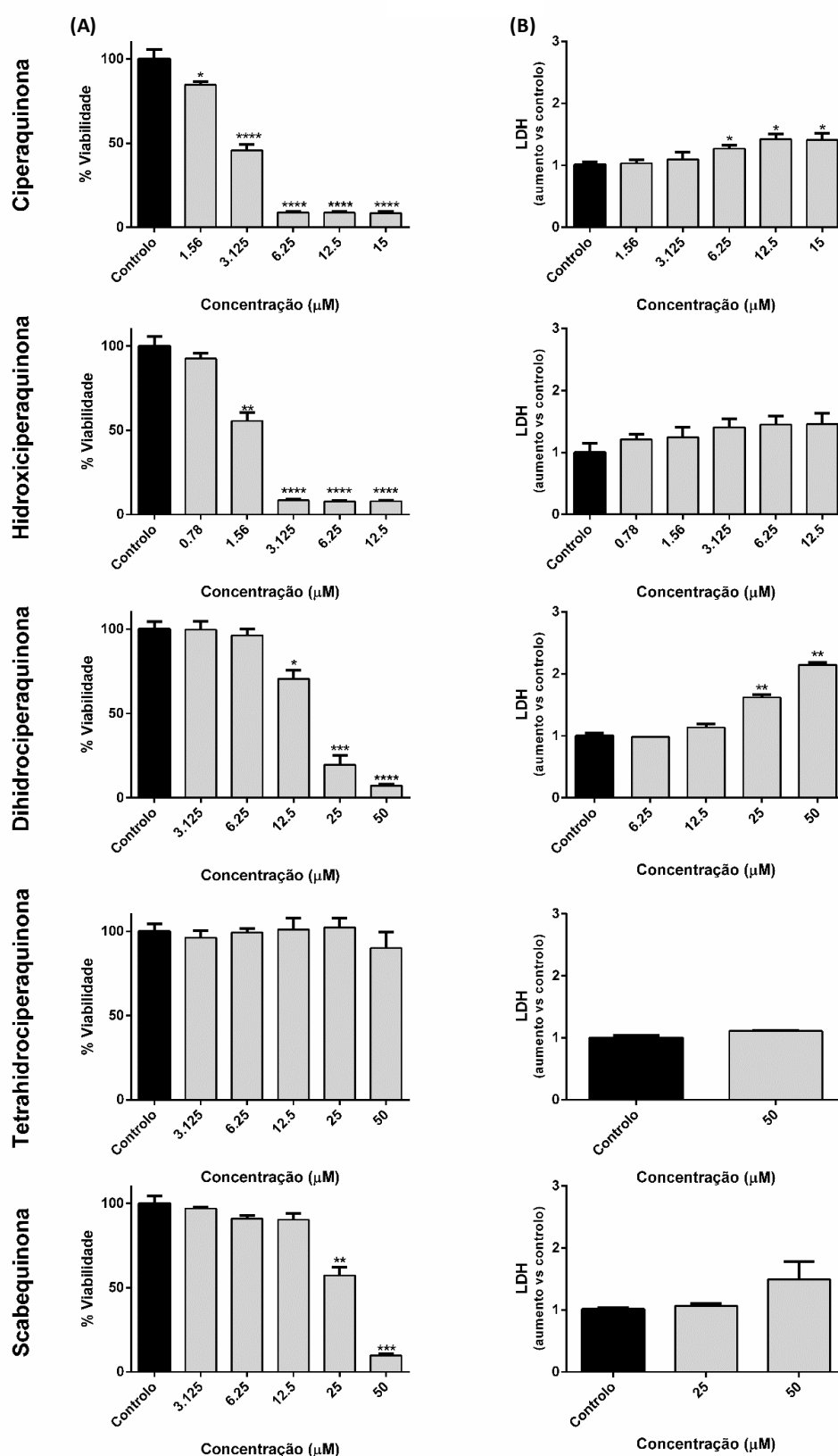


Figura 9 - Efeito das benzoquinonas na viabilidade (A) e integridade da membrana celular (B) na linha celular AGS. As células (densidade: $1,5 \times 10^4$) foram incubadas com as diferentes concentrações das benzoquinonas a 37°C, durante 24 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média de cinco concentrações, em triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado com o respetivo controlo.

De forma a perceber se as benzoquinonas testadas poderiam ser mais tóxicas para células cancerígenas do que para células normais, foi testada a viabilidade e a integridade da membrana da linha celular MRC-5. Os resultados mostraram que apenas a dihidrociperaquinona apresentou um IC_{50} maior quando comparado com a linha celular AGS, ou seja, é menos tóxica para a linha celular não-cancerígena. As restantes benzoquinonas exibiram IC_{50} na mesma gama de valores das linhas celulares cancerígenas (fig.10). A hidroxiciperaquinona continua a ser a mais tóxica. No então, relativamente à integridade da membrana apenas a hidroxiciperaquinona e a ciperaquinona mostraram provocar rutura da mesma nas concentrações mais elevadas.

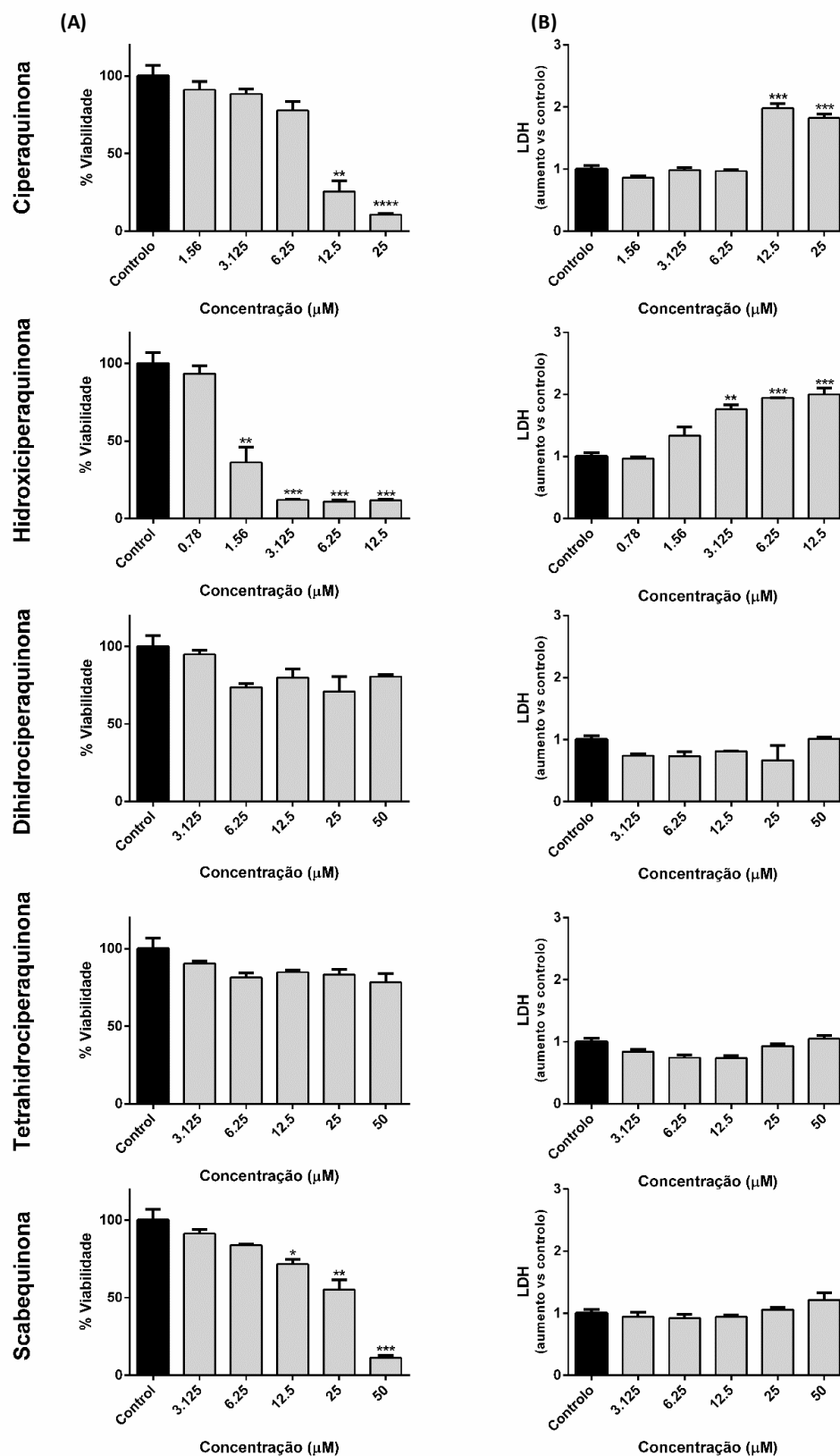


Figura 10 - Efeito das benzoquinonas na viabilidade na linha celular MRC-5. As células (densidade: 2×10^4) foram incubadas com as diferentes concentrações das benzoquinonas a 37°C, durante 24 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média de cinco concentrações, em triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ comparado com o respetivo controlo.

4.2. Morfologia celular

Com o intuito de perceber os mecanismos relacionados com a toxicidade evidenciada nos resultados anteriores, foi analisada a morfologia da célula da linha celular AGS com 24 horas de exposição à ciperquinona e à hidroxyciperquinona nas concentrações do IC₅₀. Foram escolhidas estas duas benzoquinonas para este ensaio uma vez que foram as duas que apresentaram maior toxicidade nesta linha celular. Comparando a morfologia da célula com o controlo, foi possível observar condensação da cromatina com redução do tamanho da célula e ainda a formação de corpos apoptóticos com ambos os compostos (fig.11). Esta alteração na morfologia da célula provocada pela exposição a estas benzoquinonas sugerem que a toxicidade apresentada tem por base a mecanismos que levam à ocorrência de apoptose programada (58).

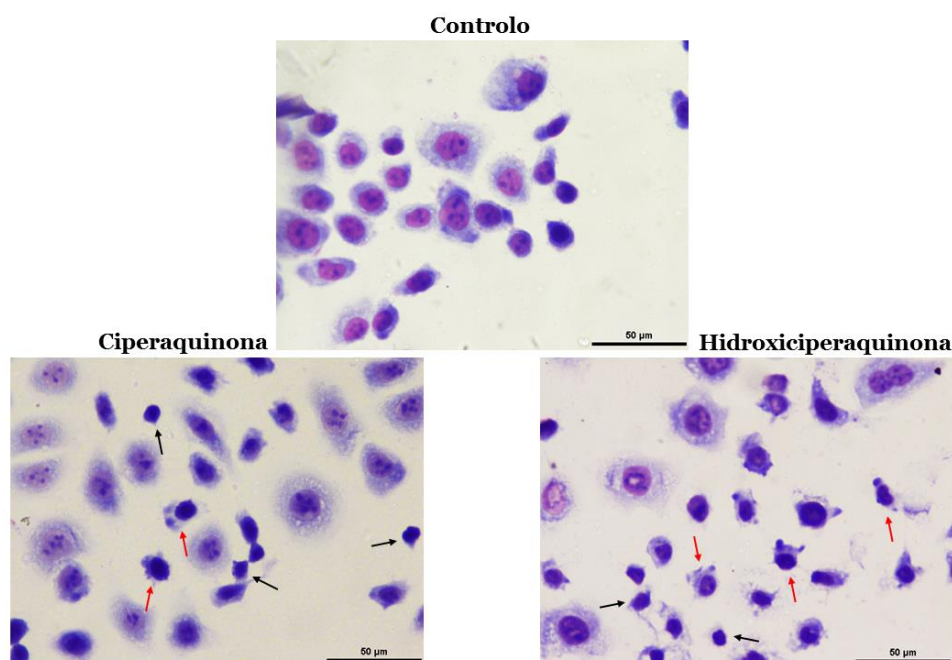


Figura 11 – Avaliação da alteração na morfologia celular em AGS pela incubação com ciperquinona e hidroxyciperquinona na concentração do IC₅₀ por 24 horas de incubação com a coloração Giemsa com 40x de ampliação (setas a vermelho: fragmentação nuclear; preto: condensação da cromatina).

4.3. Formação de EROs

Como referido anteriormente, a produção de EROs pela célula é indicativo de *stress* no seu interior (69). Foram avaliados os níveis de produção de EROs provocados pela exposição às benzoquinonas estudadas neste trabalho na linha celular AGS, usando a estaurosporina como controlo positivo.

De acordo com os dados obtidos, apenas a dihidrociperquinona e a hidroxyciperquinona levaram a um aumento da produção de EROs comparativamente ao

controle. A dihidrociperaquinona mostrou ser um potente indutor de EROs, uma vez que levou a um aumento de aproximadamente 500% da sua produção (fig.12).

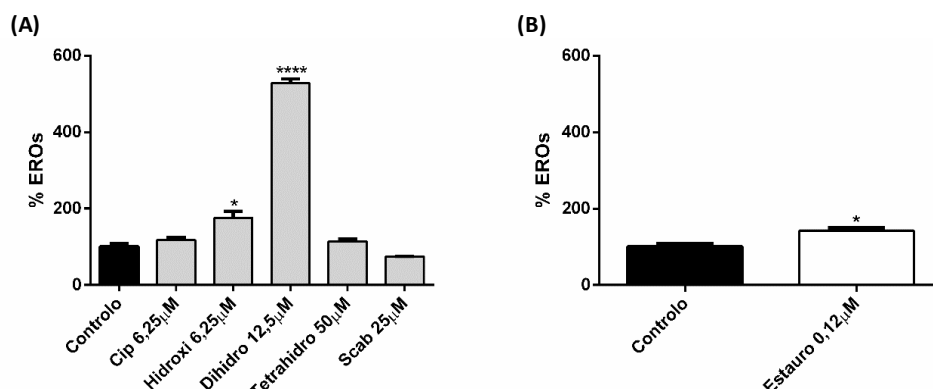


Figura 12 - Efeito das benzoquinonas na produção de EROs na linha celular AGS. As células ($1,5 \times 10^4$) foram incubadas nas concentrações mais altas de LDH negativo das benzoquinonas (A) e staurosporina (B – controle positivo) a 37°C, durante 8 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média de cada concentração estudada e em triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ comparado com o respectivo controle.

4.4. Caspases

4.4.1. Caspase 3/7

Tendo em conta a redução de viabilidade e alterações na morfologia celular provocadas pelas benzoquinonas, foram desta forma considerados mecanismos de morte celular programada, em particular a apoptose dependente de caspases. Assim, foi avaliada a atividade de caspases específicas após tratamento com as benzoquinonas.

Através dos resultados obtidos podemos verificar que, a incubação com tetrahidrociperaquinona resultou no aumento da atividade de caspase-3/7, comparativamente com o controle. A estaurosporina a 500 nM foi utilizada como controle positivo (56). Desta forma, temos evidências da ocorrência de um mecanismo de morte celular por apoptose através da via intrínseca (fig.13).

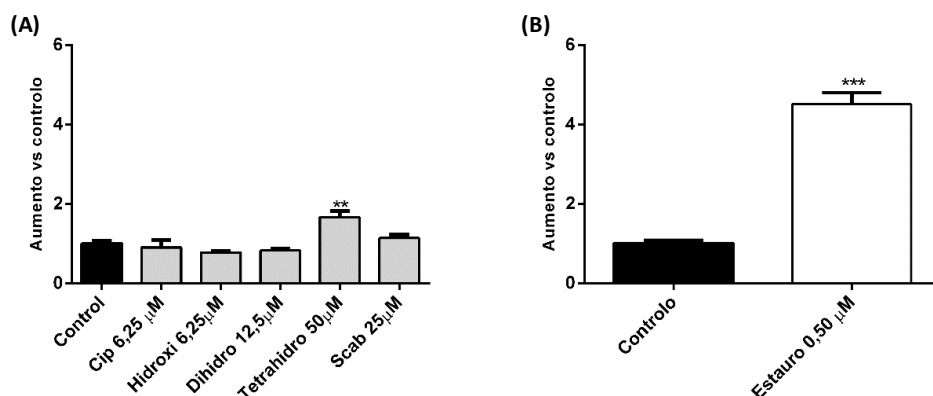


Figura 13 - Efeito das benzoquinonas na ativação das caspases 3/7 na linha celular AGS. As células ($1,5 \times 10^4$) foram incubadas nas concentrações mais altas de LDH negativo das benzoquinonas (A) e

staurosporina (B – controlo positivo) a 37°C, durante 8 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média de cada concentração estudada e em triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ comparado com a respetiva benzoquinona.

4.4.2. Caspase 4

A caspase-4 é uma caspase residente do RE e está associada à ativação da caspase-3 quando ocorre apoptose associada ao RE, para além de ser uma caspase que está envolvida em processos de inflamação (58, 70). Assim, como tivemos ativação da caspase-3 pela exposição às benzoquinona, foi testada a capacidade de estes compostos ativarem a caspase-4 e a anterior ativação ocorrer como consequência desta.

Pelos resultados obtidos, parece existir ativação da caspase-4 na presença da tetrahidrociperaquinona e da scabequinona. A tetrahidrociperaquinona anteriormente também mostrou ativar a caspase-3 (fig.14). Como controlo positivo foi utilizado o ácido palmítico, ativador da caspase-3 (71) por ativação prévia da caspase-4, como mostram os resultados obtidos.

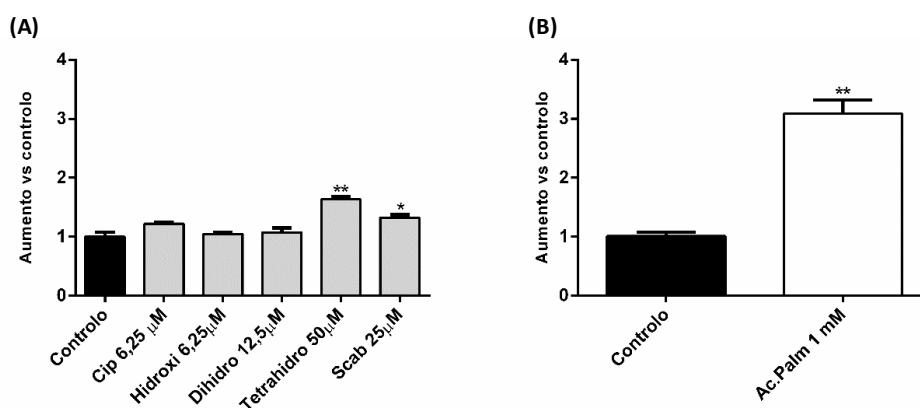


Figura 14 - Efeito das benzoquinonas na ativação da caspase 4 da célula na linha celular AGS. As células (1,5x10⁴) foram incubadas nas concentrações mais altas de LDH negativo das benzoquinonas (A) e ácido palmítico (B – controlo positivo) a 37°C, durante 8 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média de cada concentração estudada e em triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ comparado com o controlo.

4.4.3. Caspase 9

A caspase-9 é também uma das caspases classificadas como apoptóticas, tal como a caspase-3. Quando a célula recebe um estímulo apoptótico pode ocorrer a despolarização da membrana da mitocôndria e consequente rutura da mesma, que levará à saída do citocromo c para o citosol. No citosol o citocromo c vai levar à ativação do apoptossoma que, uma vez ativo induz a ativação da caspase-9. A caspase-3 pode ser também ativada por esta caspase, dando início à ativação das caspases em cascata e aos processos apoptóticos. Assim, a caspase-9 é considerada ativadora e a caspase-3 como sendo executora (72).

A estaurosporina foi utilizada como controlo positivo e nenhuma das benzoquinonas nas concentrações testadas mostrou ativar esta caspase (fig.15).

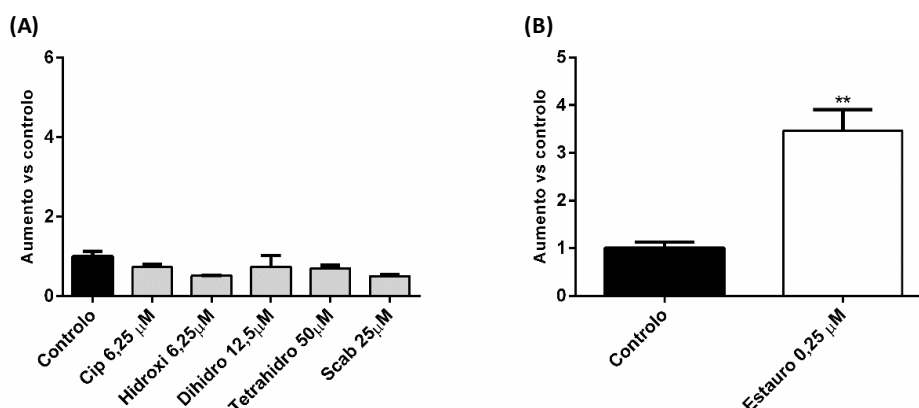


Figura 15 - Efeito das benzoquinonas na ativação da caspase 9 na linha celular AGS. As células ($1,5 \times 10^4$) foram incubadas nas concentrações mais altas de LDH negativo das benzoquinonas (A) e estaurosporina (B – controlo positivo) a 37°C , durante 8 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média de cada concentração estudada e em triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ comparado com o controlo.

4.5. Doseamento do Ca^{2+}

As concentrações de Ca^{2+} no citosol são controladas para que se mantenham em valores na ordem do nanomolar, uma vez que concentrações elevadas deste catião são tóxicas e podendo ainda levar à morte da célula (56). A sinalização do Ca^{2+} tem vindo a ser utilizada para mediar processos celulares críticos que levem à tumorigénese, à formação de metástases, a alterações no ciclo celular e à ocorrência de apoptose (73). A taspigargina foi utilizada como controlo positivo, uma vez que está descrita a sua capacidade de esvaziamento das reservas de cálcio intracelular, pela inibição da SERCA.

Segundo os resultados obtidos, depois de a linha celular sofrer uma exposição às benzoquinonas por uma hora, foram registadas alterações nos níveis de cálcio para todas os compostos, com exceção da tetrahidrociperaquinona (fig.16). Podemos ainda observar que os compostos que apresentaram aumento deste catião parecem ser mais potentes do que o controlo positivo. Desta forma podemos colocar a hipótese de que o RE poderá estar

envolvido no mecanismo de ação destas benzoquinonas, uma vez que, é o principal local de armazenamento de Ca^{2+} na célula como referido anteriormente.

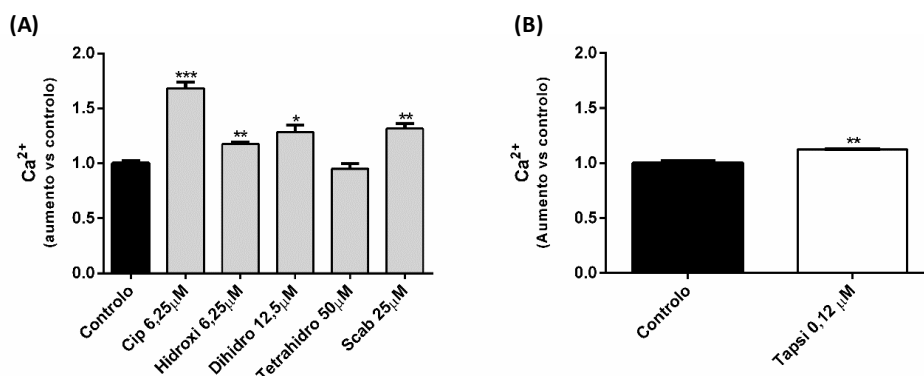


Figura 16 - Efeito das benzoquinonas na libertação de Ca^{2+} da célula na linha celular AGS. As células ($1,5 \times 10^4$) foram incubadas nas concentrações mais altas de LDH negativo das benzoquinonas (A) e tapsigargina (B – controlo positivo) a 37°C durante 8 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média de cada concentração estudada e em triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ comparado com o controlo.

4.6. Inibidores de vias da UPR

4.6.1. 4 μ 8C e Salubrinal

Face aos resultados obtidos na alteração dos níveis de Ca^{2+} provocados pelas benzoquinonas testadas, colocou-se a hipótese de haver envolvimento do RE, motivo pelo qual foram estudadas as vias de sinalização deste organelo. Este organelo celular é o maior local de armazenamento de Ca^{2+} e, como se encontra descrito na bibliografia, 4 μ 8C e salubrinal são dois compostos que inibem vias específicas de controlo de qualidade de proteínas no RE com indução de *stress* neste organelo celular (64, 65). Estas vias podem assim estar associadas aos resultados obtidos na alteração dos níveis de Ca^{2+} . 4 μ 8C é caracterizado por bloquear a ribonuclease IRE1 α ao quebrar a sua lisina e por uma inibição não competitiva (64, 74). Este composto tem ainda a capacidade de inibir o *splicing* do XBP-1 e a atividade do RIDD. O salubrinal vai atuar nas fosfatases que vão atuar sobre o eIF2 α , aumentando a sua desfosforilação e consequente inibição da PERK. Este aumento da fosforilação do eIF2 α irá levar a um decréscimo na quantidade de proteínas a que vão adquirir a sua conformação correta no RE e assim, há uma acumulação de proteínas com uma conformação incorreta dentro do RE levando a *stress* reticular (65, 75).

Nenhuma das benzoquinonas estudadas parece reverter o efeito do inibidor 4 μ 8C, que se verificaria por um aumento da viabilidade celular na presença do inibidor com a benzoquinona comparativamente com apenas a benzoquinona (fig.17). Face a estes resultados, podemos inferir que, aparentemente, as benzoquinonas em estudo não parecem atuar pela via do IRE1 α e não provocam alteração dos níveis de cálcio por inibição desta

ribonuclease. No entanto, parecem existir diferenças significativas quando é usado o inibidor salubrinal com a ciperquinona do que apenas a quinona, observando-se um aumento da viabilidade celular, e uma redução na presença do inibidor com a hidroxiciperaquinona (fig.18). Com a co-incubação da ciperquinona na presença do inibidor salubrinal podemos dizer que a toxicidade provocada por esta benzoquinona envolve a ativação da via PERK/eIF2 α e, conseqüentemente, a ativação da via da UPR, uma vez que parece existir uma resposta contra a toxicidade. Por outro lado, a hidroxiciperaquinona na presença deste inibidor parece aumentar a toxicidade e assim não ativar as vias referidas anteriormente.

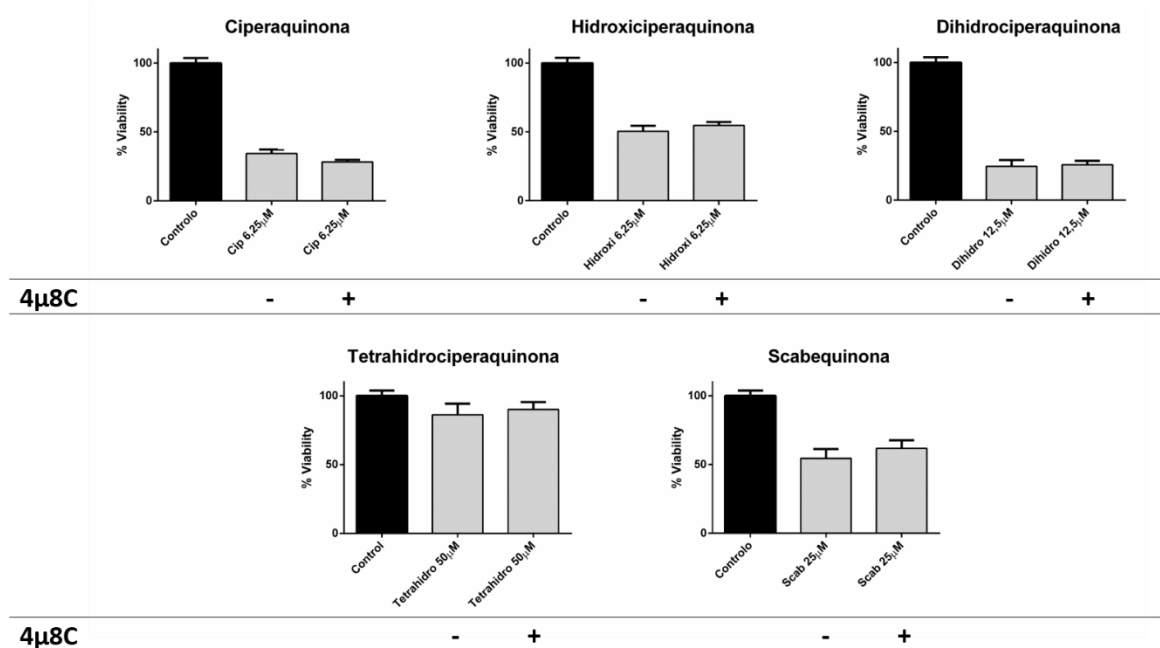


Figura 17 - Efeito das benzoquinonas na presença do inibidor 4 μ 8C na linha celular AGS. As células (1,5x10⁴) foram incubadas nas concentrações mais altas de LDH negativo das benzoquinonas a 37°C, durante 8 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média de cada concentração estudada e em triplicado. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 comparado com a respetiva benzoquinona.

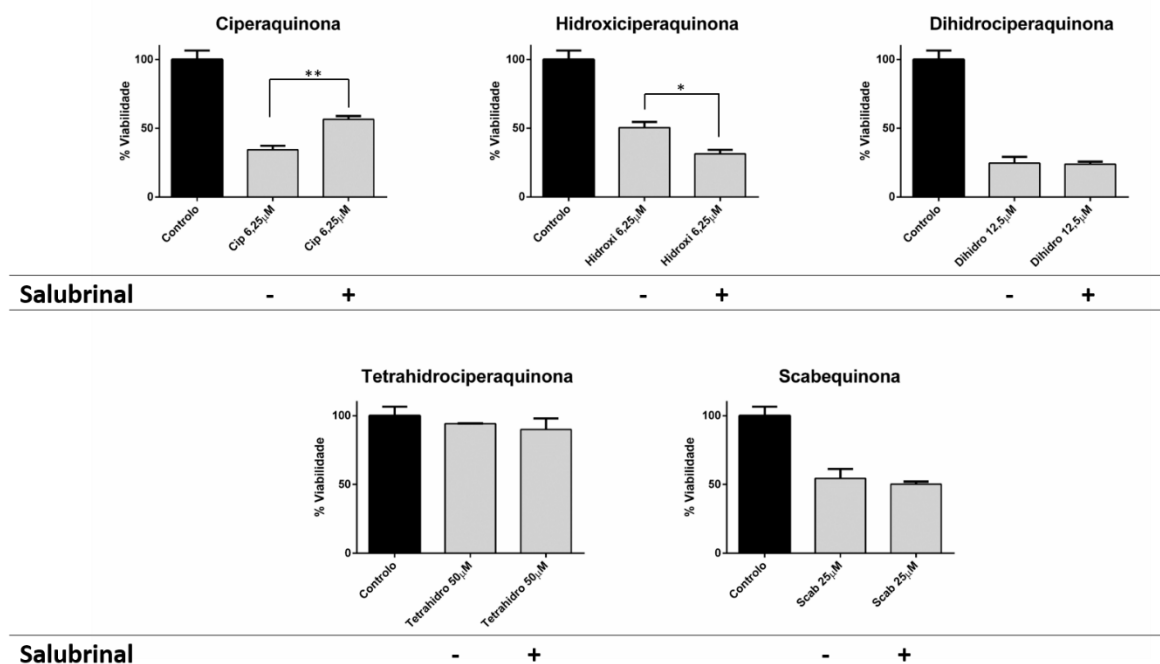


Figura 18 - Efeito das benzoquinonas na presença do inibidor salubrinal na linha celular AGS. As células ($1,5 \times 10^4$) foram incubadas nas concentrações mais altas de LDH negativo das benzoquinonas a 37°C , durante 8 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média de cada concentração estudada e em triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ comparado com a respetiva benzoquinona.

4.7. Proteossoma 20S

Com o intuito de avaliar o potencial destas benzoquinonas como novos inibidores do proteossoma, nomeadamente do proteossoma 20S, a subunidade catalítica do proteossoma 26S foi exposta aos compostos estudados neste trabalho. A lactacistina foi usada como controlo positivo neste ensaio, uma vez que é descrita na bibliografia como inibidor de referência do proteossoma (1, 56, 76, 77).

À semelhança dos resultados anteriores, é a hidroxiciperquinona que apresenta maior capacidade de inibição desta subunidade, com um IC_{50} de $1,694 \mu\text{M}$ (tabela 1). A scabequinona é a segunda benzoquinona mais potente, seguida da dihidroxciperquinona. As benzoquinonas que apresentaram menor potencial de inibição da subunidade catalítica do proteossoma 26S foram a ciperquinona e a tetrahidroxciperquinona (fig. 19).

Tendo em conta que neste ensaio apenas temos a subunidade catalítica do proteossoma 26S, a estrutura tridimensional da benzoquinona deve ser tida em consideração. Assim, a inserção de um grupo hidroxilo no isopropilo, a remoção de uma ligação dupla e a presença de um furano parecem favorecer a interação com o local ativo desta subunidade catalítica (fig20).

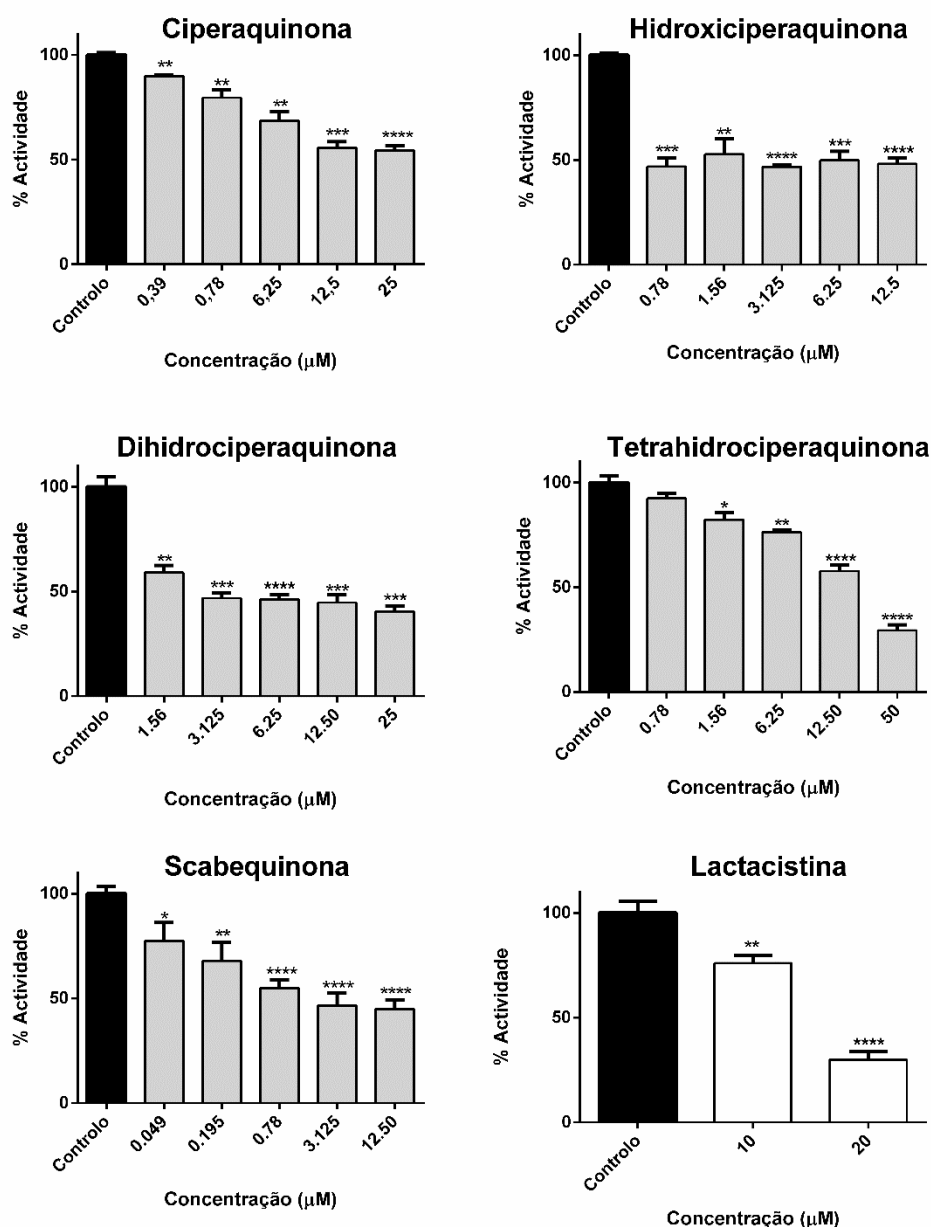


Figura 19 -Efeito das benzoquinonas na atividade da subunidade catalítica do proteossoma 26S (proteossoma 20S). As benzoquinonas foram incubadas juntamente com o proteossoma 20S e o péptido AMC 37°C, durante 2 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média de cinco concentrações e em triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ comparado com o respetivo controlo. A lactacistina foi usada como controlo positivo.

A toxicidade provocada pela hidroxiciperaquinona nas linhas celulares estudadas pode estar relacionada com a inibição do proteossoma, indução de EROs e inibição da PERK apresentada por este composto. Com a inibição do proteossoma, a eliminação de proteínas com uma conformação incorreta deixa de ocorrer, levando à sua acumulação no interior da célula. Esta acumulação excessiva de proteínas com uma conformação incorreta leva ao aumento da produção de EROs e, consequentemente, a *stress* no interior da célula. No

entanto, este composto parece também aumentar o efeito do inibidor salubrinal (inibidor da PERK), inativando a UPR e assim inibindo o redirecionamento das proteínas com uma conformação incorreta para os *chaperones* e para o proteossoma. Olhando ainda para as diferenças estruturais entre as cinco benzoquinonas estudadas, a presença de um grupo hidroxilo nesta molécula parece ser favorável ao desenvolvimento de novos fármacos podendo ter como alvo a inibição do proteossoma (fig20).

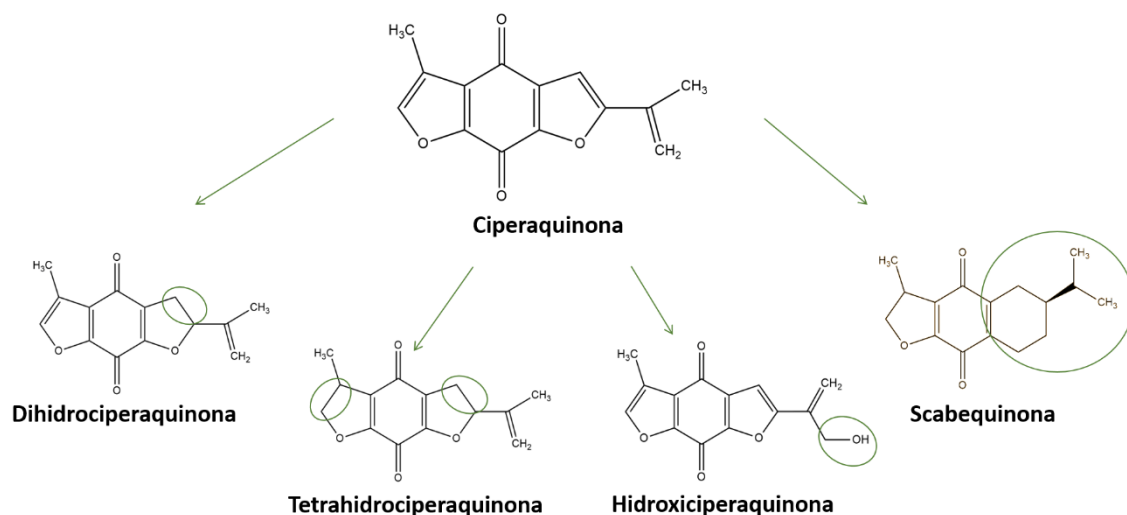


Figura 20 - Estruturas químicas das benzoquinonas estudadas com a evidência das diferenças entre elas.

Apesar de a ciperquinona apresentar maior toxicidade do que a dihidrociperquinona, esta benzoquinona apresenta um IC_{50} relativamente baixo na linha celular AGS (16,8 μM) e é a segunda mais potente no que diz respeito à inibição do proteossoma 20S. É ainda a molécula que levou a maior produção de EROs. Este aumento excessivo na produção de EROs e, consequentemente, da sua toxicidade, pode ter como ponto de partida a inibição do proteossoma. Comparativamente à ciperquinona, do ponto de vista estrutural, a remoção de uma ligação dupla parece que lhe conferiu melhores potencialidades (fig.20).

Face aos resultados obtidos, a scabequinona que estruturalmente representa a inserção de um furano na molécula da ciperquinona, poderá também ter potencial para o desenvolvimento de um novo quimioterápico (fig.20). Esta benzoquinona revelou ser tóxica e inibidora do proteossoma 20S em concentrações na ordem dos 30 μM . No entanto, esta molécula tem a capacidade de reduzir a produção de EROs em comparação com o grupo controlo. A homeostase celular tem em conta também os níveis de EROs dentro da célula. Níveis de EROs quer elevados ou baixos vão alterar a homeostase da célula e consequentemente a indução de *stress* celular, desencadeando a ativação de vias apoptóticas e, por fim, morte celular.

5. Conclusão

Neste trabalho foi possível concluir que os mecanismos subjacentes à morte celular provocada pelas benzoquinonas estudadas é maioritariamente independente das caspases. No entanto, foi possível verificar que influenciam o funcionamento do retículo endoplasmático pela alteração da homeostase e ativação da UPR, com indução da fosforilação de eIF2 α .

Estas benzoquinonas mostraram ainda potencialidade na inativação da via do proteossoma e no controlo de qualidade de proteínas.

Assim, podemos afirmar que a natureza é uma vez mais uma fonte promissora de compostos com potencial de serem usados no desenvolvimento de novos fármacos com potencial quimioterápico.

6. Bibliografia

1. Pereira DM, Valentão P, Correia-da-Silva G, Teixeira N, Andrade PB. Translating endoplasmic reticulum biology into the clinic: a role for ER-targeted natural products? *Natural Product Reports*. 2015;32:705-22.
2. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Essential Cell Biology*. New York and London: Garland Science; 2010.
3. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott MP, et al. *Molecular Cell Biology*. San Francisco: W.H.Freeman; 2004.
4. Xu Z, Chikka MR, Xia H, Ready DF. Ire1 supports normal ER differentiation in developing *Drosophila* photoreceptors *Journal of Cell Science* 2016;1-27.
5. Sweadner KJ, Donnet C. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the $\text{Ca}^{(2+)}$ -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*. 2001;356(Pt 3):685-704.
6. Martonosi AN, Pikula S. The structure of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochim Pol*. 2003;50(2):337-65.
7. Kang S, Dahl R, Hsieh W, Shin A, Zsebo KM, Buettner C, et al. Small Molecular Allosteric Activator of the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) Attenuates Diabetes and Metabolic Disorders. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(10):5185-98.
8. Brini M, Carafoli E, Calì T. The plasma membrane calcium pumps: focus on the role in (neuro)pathology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;1-9.
9. Zhang J, Yi M, Zha L, Chen S, Li Z, Li C, et al. Sodium Butyrate Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Colorectal Cells :Implications for Apoptosis. *PLoSOne*. 2016;11:1-25.
10. Jung TW, Choi KM. Pharmacological Modulators of Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(2):192.

11. Perri ER, Thomas CJ, Parakh S, Spencer DM, Atkin JD. The Unfolded Protein Response and the Role of Protein Disulfide Isomerase in Neurodegeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2015;3:80.
12. Murugan D, Lau SY, Lau WC, Mustafa MR, Huang Y. Angiotensin 1-7 Protects against ANgiotensin II - Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Endothelial Dysfunction via Mas Receptor. *PLoSOne*. 2015;10:1-12.
13. Timberlake II MA, Dwivedi Y. Altered Expression of Endoplasmic Reticulum Stress Associated Genes in Hippocampus of Learned Helpless Rats: Relevance to Depression Pathophysiology. *Frontiers in Pharmacology*. 2016;6:1-9.
14. Le Reste P-J, Avril T, Quillien V, Morandi X, Chevet E. Reprint of: Signaling the Unfolded Protein Response in primary brain cancers. *Brain Research*. 2016;1648:542-52.
15. Bozaykut P, Sahin A, Karademir B, Ozer NK. Endoplasmic reticulum stress related molecular mechanisms in nonalcoholic steatohepatitis. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2016;157:17-29.
16. Ranek MJ, Wang X. Activation of the Ubiquitin Proteasome System in Doxorubicin Cardiomyopathy. *Current hypertension reports*. 2009;11(6):389-95.
17. Jiang Y, Zhou Y, Zheng Y, Guo H, Gao L, Chen P, et al. Expression of inositol-requiring enzyme 1 β is downregulated in colorectal cancer. *Oncology Letters*. 2017;13(3):1109-18.
18. van den Boomen DJH, Lehner PJ. Identifying the ERAD ubiquitin E3 ligases for viral and cellular targeting of MHC class I. *Molecular Immunology*. 2015;68(2):106-11.
19. Słomińska-Wojewódzka M, Sandvig K. The Role of Lectin-Carbohydrate Interactions in the Regulation of ER-Associated Protein Degradation. *Molecules*. 2015;20(6).
20. Griciuc A, Aron L, Ueffing M. ER stress in retinal degeneration: a target for rational therapy? *Trends in Molecular Medicine*. 2011;17(8):442-51.
21. Dias-Teixeira KL, Calegari-Silva TC, Dos Santos GRRM, Vitorino dos Santos J, Lima C, Medina JM, et al. The integrated endoplasmic reticulum stress response in *Leishmania*

amazonensis macrophage infection: the role of X-box binding protein 1 transcription factor. *The FASEB Journal*. 2016;30(4):1557-65.

22. French WS, Masouminia M, Samadzadeh S, Tillman CB, Mendoza A, French AB. Role of Protein Quality Control Failure in Alcoholic Hepatitis Pathogenesis. *Biomolecules*. 2017;7(1):11.

23. Yang S-Y, Wei F-L, Hu L-H, Wang C-L. PERK-eIF2 α -ATF4 pathway mediated by endoplasmic reticulum stress response is involved in osteodifferentiation of human periodontal ligament cells under cyclic mechanical force. *Cellular Signalling*. 2016;28(8):880-6.

24. Yu Z, Sheng H, Liu S, Zhao S, Glembotski CC, Warner DS, et al. Activation of the ATF6 branch of the unfolded protein response in neurons improves stroke outcome. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2016;37(3):1069-79.

25. Gallagher CM, Walter P. Ceapins inhibit ATF6 α signaling by selectively preventing transport of ATF6 α to the Golgi apparatus during ER stress. *eLife*. 2016;5:11880.

26. Tampakakis E, Tabit CE, Holdbrook M, Linder EA, Berk BD, Frame AA, et al. Intravenous Lipid Infusion Induces Endoplasmic Reticulum Stress in Endothelial Cells and Blood Mononuclear Cells of Healthy Adults. *Journal of the American Heart Association*. 2015;1-11.

27. Kupsco A, Schlenk D. Molecular mechanisms of selenium-Induced spinal deformities in fish. *Aquatic Toxicology*. 2016;179:143-50.

28. Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *The FEBS Journal*. 2016;283(14):2640-52.

29. García de la Cadena S, Massieu L. Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12. *Apoptosis*. 2016;21(7):763-77.

30. Dabrowska C, Li M, Fan Y. Apoptotic Caspases in Promoting Cancer: Implications from Their Roles in Development and Tissue Homeostasis. In: Gregory DC, editor. *Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy: New Perspectives and Opportunities*. Cham: Springer International Publishing; 2016;89-112.

31. White MM, Gargoum F, Browne N, Hurley K, McElvaney NG, Reeves EP. New Research on the Importance of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function for Optimal Neutrophil Activity. In: Wat D, editor. Cystic Fibrosis in the Light of New Research. Rijeka: InTech; 2015:11.
32. Noolu B, Ajumeera R, Chauhan A, Nagalla B, Manchala R, Ismail A. Murraya koenigii leaf extract inhibits proteasome activity and induces cell death in breast cancer cells. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2013;13:1472-6882.
33. Berg JM, Tymoczko, J. L., & Stryer, L. Protein turnover and amino acid catabolism. Biochemistry. 2002:942-51.
34. Semren N, Habel-Ungewitter C, Fernandez IE, Konigshoff M, Eickelberg O, Stoger T, et al. Validation of the 2nd Generation Proteasome Inhibitor Oprozomib for local Therapy of Pulmonary Fibrosis. PLoS ONE. 2015;10:1-21.
35. Daniela Correia da S, Paula BA, Vera R, Patrícia V, David P. Recent Patents on Proteasome Inhibitors of Natural Origin Natural Proteasome Inhibitors. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery. 2017;12:1-12.
36. Lu L, Qin A, Huang H, Zhou P, Zhang C, Liu N, et al. Shikonin extracted from medicinal Chinese herbs exerts anti-inflammatory effect via proteasome inhibition. European Journal of Pharmacology. 2011;658:242-7.
37. Grover A, Shandilya A, Bisaria VS, Sundar D. Probing the anticancer mechanism of prospective herbal drug Withaferin A on mammals: a case study on human and bovine proteasomes. BMC Genomics. 2010;11:1471-2164.
38. Grigoreva T, Tribulovich V, Garabadzhiu A, Melino G, Barlev N. The 26S proteasome is a multifaceted target for anti-cancer therapies. Oncotarget. 2015;6:24733-49.
39. George VC, Dellaire G, Rupasinghe HPV. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2017;45:1-14.

40. Zhu F, Ma XH, Qin C, Tao L, Liu X, Shi Z, et al. Drug Discovery Prospect from Untapped Species: Indications from Approved Natural Product Drugs. PLoS ONE. 2012;7(7):39782.
41. Gregersen N, Bross P, Vang S, Christensen JH. Protein misfolding and human disease. Annual Review of Genomics and Human Genetics. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 7. Palo Alto: Annual Reviews; 2006;103-24.
42. Winter JM, Tang Y. Synthetic Biological Approaches to Natural Product Biosynthesis. Current opinion in biotechnology. 2012;23(5):736-43.
43. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. Molecules. 2016;21(5):559.
44. Muschietti L, Vila R, Filho VC, Setzer W. Tropical Protozoan Diseases: Natural Product Drug Discovery and Development. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM. 2013;2013:404250.
45. Leal MC, Madeira C, Brandão CA, Puga J, Calado R. Bioprospecting of Marine Invertebrates for New Natural Products — A Chemical and Zoogeographical Perspective. Molecules. 2012;17(8).
46. Monciardini P, Iorio M, Maffioli S, Sosio M, Donadio S. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. Microbial Biotechnology. 2014;7(3):209-20.
47. Moreira MM. Benzoquinonas existentes em espécies de cyperus da flora Portuguesa - Contribuição para o seu conhecimento: Porto; 1990.
48. Hu Q-P, Cao X-M, Hao D-L, Zhang L-L. Chemical Composition, Antioxidant, DNA Damage Protective, Cytotoxic and Antibacterial Activities of Cyperus rotundus Rhizomes Essential Oil against Foodborne Pathogens. Scientific Reports. 2017;7:45231.
49. Peerzada AM, Ali HH, Naeem M, Latif M, Bukhari AH, Tanveer A. Cyperus rotundus L.: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology. 2015;174:540-60.

50. Neamsuvan O, Phumchareon T, Bunphan W, Kaosaeng W. Plant materials for gastrointestinal diseases used in Chawang District, Nakhon Si Thammarat Province, Thailand. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;194:179-87.
51. Nassar MI, Abdel-Razik AF, El-Khrisy EE-DAM, Dawidar A-AM, Bystrom A, Mabry TJ. A benzoquinone and flavonoids from *Cyperus alopecuroides*. *Phytochemistry*. 2002;60(4):385-7.
52. Morimoto M, Shimomura Y, Mizuno R, Komai K. Electron Transport Inhibitor in *Cyperus javanicus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2001;65(8):1849-51.
53. Seabra RM, Andrade PB, Ferreres F, Moreira MM. Methoxylated aurones from *cyperus capitatus*. *Phytochemistry*. 1997;45(4):839-40.
54. Nyasse B, Ghogomu R, B.L. Sondengam T, Martin MT, Bodo B. Mandassidione and other sesquiterpenic ketones from *Cyperus articulatus*. *Phytochemistry*. 1988;27(10):3319-21.
55. Sousa E. Quinonas no ar atmosférico: Determinação, concentrações e correlações entre as fases vapor e particulada. Salvador: Universidade federal da Bahia; 2012.
56. da Silva DC, Andrade PB, Valentão P, Pereira DM. Neurotoxicity of the steroidal alkaloids tomatine and tomatidine is RIP1 kinase- and caspase-independent and involves the eIF2 α branch of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;9.
57. David MP, Georgina C-d-S, Patricia V, Natercia T, Paula BA. GC-MS Lipidomic Profiling of the Echinoderm *Marthasterias glacialis* and Screening for Activity Against Human Cancer and Non-Cancer Cell Lines. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2014;17(5):450-7.
58. Silva TC, de Andrade PB, Paiva-Martins F, Valentão P, Pereira DM. In Vitro Anti-Inflammatory and Cytotoxic Effects of Aqueous Extracts from the Edible Sea Anemones *Anemonia sulcata* and *Actinia equina*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(3):653.

59. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, Arkin M, Auld D, Austin C, et al., editors. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD)2004.
60. Zou Y, Kim D, Yagi M, Yamasaki Y, Kurita J, Iida T, et al. Application of LDH-Release Assay to Cellular-Level Evaluation of the Toxic Potential of Harmful Algal Species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2013;77(2):345-52.
61. Pereira RB, Taveira M, Valentao P, Sousa C, Andrade PB. Fatty acids from edible sea hares: anti-inflammatory capacity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells involves iNOS modulation. *RSC Advances*. 2015;5(12):8981-7.
62. Pereira RB, Pinto DCGA, Pereira DM, Gomes NGM, Silva AMS, Andrade PB, et al. UHPLC-MS/MS profiling of *Aplysia depilans* and assessment of its potential therapeutic use: Interference on iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and caspase-mediated pro-apoptotic effect on SH-SY5Y cells. *Journal of Functional Foods*. 2017;37:164-75.
63. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1):248-54.
64. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, et al. A Selective Inhibitor of eIF2 α Dephosphorylation Protects Cells from ER Stress. *Science*. 2005;307(5711):935.
65. Cross BCS, Bond PJ, Sadowski PG, Jha BK, Zak J, Goodman JM, et al. The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(15):869-78.
66. Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*. 1998;243(2):359-66.

67. Yamamoto R, Lin LS, Lowe R, Warren MK, White TJ. The human lung fibroblast cell line, MRC-5, produces multiple factors involved with megakaryocytopoiesis. *The Journal of Immunology*. 1990;144(5):1808.
68. Barker R, Abrahamsson B, Kruusmägi M. Application and Validation of an Advanced Gastrointestinal In Vitro Model for the Evaluation of Drug Product Performance in Pharmaceutical Development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;103(11):3704-12.
69. Lawless MW, O'Byrne KJ, Gray SG. Targeting oxidative stress in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2010;14(11):1225-45.
70. Viganò E, Diamond CE, Spreafico R, Balachander A, Sobota RM, Mortellaro A. Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nature Communications*. 2015;6:8761.
71. Ulloa JE, Casiano CA, De Leon M. Palmitic and stearic fatty acids induce caspase-dependent and -independent cell death in nerve growth factor differentiated PC12 cells. *Journal of neurochemistry*. 2003;84(4):655-68.
72. Kuida K. Caspase-9. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2000;32(2):121-4.
73. Dang D, Rao R. Calcium-ATPases: Gene disorders and dysregulation in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2016;1863(6, Part B):1344-50.
74. Heindryckx F, Binet F, Ponticos M, Rombouts K, Lau J, Kreuger J, et al. Endoplasmic reticulum stress enhances fibrosis through IRE1 α -mediated degradation of miR-150 and XBP-1 splicing. *EMBO Molecular Medicine*. 2016;8(7):729-44.
75. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Molecular Cell*. 2000;5(5):897-904.
76. Take A, Matsumoto A, Omura S, Takahashi Y. *Streptomyces lactacystinicus* sp. nov. and *Streptomyces cyslabdanicus* sp. nov., producing lactacystin and cyslabdan, respectively. *J Antibiot*. 2015;68(5):322-7.

77. Dasgupta S, Castro LM, Dulman R, Yang C, Schmidt M, Ferro ES, et al. Proteasome Inhibitors Alter Levels of Intracellular Peptides in HEK293T and SH-SY5Y Cells. PLoS ONE. 2014;9(7):103604.